



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE CÉLULAS COM O FENÓTIPO *SIDE POPULATION*  
(SP) NO ENDOMÉTRIO DA ÉGUA

ANDREIA ISABEL MENDES DIAS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa  
Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias  
Doutora Graça Maria Alexandre Pires  
Lopes de Melo

ORIENTADORA

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

CO-ORIENTADORA

Dra. Maria Rosa Rebordão Cordeiro  
Simões Crisóstomo

2014

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE CÉLULAS COM O FENÓTIPO *SIDE POPULATION*  
(SP) NO ENDOMÉTRIO DA ÉGUA

ANDREIA ISABEL MENDES DIAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa  
Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias  
Doutora Graça Maria Alexandre Pires  
Lopes de Melo

ORIENTADORA

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

CO-ORIENTADORA

Dra. Maria Rosa Rebordão Cordeiro  
Simões Crisóstomo

2014

LISBOA

---

## Agradecimentos

Aos meus pais e irmã, fundamentais na minha jornada e que desde sempre me apioaram incondicionalmente. Ao meu namorado, por ter aguentado todos os meus momentos de angústia e estar disposto a esperar. Foram sempre o meu porto-seguro.

Ao “nosso” grupo: Catarina, Marta, Zé, Lara, Eva, pelos desabafos, devaneios, gargalhadas e momentos (vários e variados!) de descontração.

Às minhas orientadora, Professora Graça Ferreira Dias, e co-orientadora, Professora Maria Rosa Rebordão, por todo o apoio, ajuda e oportunidades que me deram ao longo dos últimos meses.

À Cátia, a minha “mãe adoptiva”, pela sua companhia, ajuda e “sessões no consultório psicólogo”. Sem dúvida que os meus conhecimentos de laboratório não seriam o que são hoje sem a sua ajuda.

À Ana Amaral, a “magana”, pela companhia e rico entretenimento, bem como toda a ajuda e ensinamentos relativamente ao trabalho de laboratório.

À Dr<sup>a</sup>. Paula pelo apoio que me deu no laboratório e claro, pelos belos almoços.

Às Cláudias (Cláudia Bispo e Cláudia Andrade) e ao Dr. Rui Gardner, no Instituto Gulbenkian da Ciência (IGC), pela sua paciência nas longas horas de *sorting* e ajuda na análise e compreensão dos dados de citometria.

À Professora Graça Pires, pelo apoio durante as primeiras análises de citometria e por nos ter apresentado à equipa do IGC.

Aos Professores Mário Pinho, Fernando Ferreira e José Prates pela pronta ajuda para responder às minhas questões.

Por fim, este projecto não teria sido possível sem o financiamento da Fundação para a Ciência e a Tecnologia e o apoio do CIISA.

A todos, o meu mais sincero obrigada.

## **Resumo – Identificação e isolamento de células com o fenótipo *Side Population* (SP) no endométrio da égua**

As células estaminais apresentam potencial terapêutico e podem desempenhar um papel no desenvolvimento de certos processos patológicos. O fenótipo *Side Population* (SP) está associado a células de características estaminais e foi descrito no endométrio humano e do murganho. Para investigar a presença de células SP no endométrio equino, de 11 úteros obtidos *post-mortem* foram analisadas por citometria de fluxo diferentes populações celulares do endométrio (população mista, células epiteliais e células do estroma, n=16), após coloração com Hoechst. Seis das éguas estavam na fase folicular e três na fase lútea. Foram identificadas populações SP em todas as amostras excepto numa suspensão epitelial. A média ( $\pm$  erro-padrão) de células SP foi de  $2,78 \pm 2,01\%$  nas populações celulares mistas de endométrio,  $3,90 \pm 3,68\%$  nas células do estroma e  $7,03 \pm 6,79\%$  nas células do epitélio. A proporção de células SP foi superior nas populações obtidas do estroma e do epitélio do endométrio de éguas em fase folicular ( $p<0,01$ ) e, dentro dessas amostras, foi superior nas populações do epitélio quando comparadas com as do estroma ( $p<0,01$ ). A análise das amostras revelou que, tal como em outras espécies, é possível identificar uma população SP no endométrio da égua.

**Palavras-chave:** célula estaminal; *Side Population*; células SP; citometria de fluxo; endometrose; égua

## **Abstract – Identification and isolation of cells with *Side Population* (SP) phenotype in mare endometrium**

Stem cells present therapeutic potential and may play a role in the development of certain pathological processes. The *Side Population* (SP) phenotype is associated with cells that present characteristics of stem cells and has been described in human and mouse endometrium. To investigate the presence of SP cells in mare endometrium, from 11 uteri collected *post-mortem*, different cell populations (mixed population, epithelial cells and stromal cells, n=16) of the endometrium were analysed by flow cytometry after Hoechst dying. Six of the mares were in the follicular phase and three were in the luteal phase of the oestrous cycle. SP populations were identified in all samples except in one epithelial suspension. The average ( $\pm$  standard-error) of SP cells was  $2,78 \pm 2,01\%$  in endometrium mixed cell populations,  $3,90 \pm 3,68\%$  in stromal cells and  $7,03 \pm 6,79\%$  in epithelial cells. The proportion of SP cells was higher in populations isolated from the stroma and epithelium of mares in the follicular phase ( $p < 0,01$ ) and, within those samples, it was increased in the populations from epithelium when compared to those of the stroma ( $p < 0,01$ ). The analysis of the samples revealed that, as in other species, it is possible to identify an SP population in the mare endometrium.

**Keywords:** stem cell; Side Population; SP cells; flow cytometry; endometrosis; mare

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I. RELATÓRIO DE ESTÁGIO .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>   | <b>2</b>  |
| 1. CÉLULAS ESTAMINAIS: UMA INTRODUÇÃO .....  | 2         |
| 1.1. <i>Classificação de células estaminais</i> .....  | 2         |
| 1.2. <i>O nicho de células estaminais</i> .....  | 5         |
| 1.2.1. <i>Caracterização do nicho de células estaminais</i> .....                                  | 5         |
| 1.3. <i>Mecanismo de divisão e organização</i> .....   | 6         |
| 1.4. <i>O conceito de plasticidade celular</i> .....   | 7         |
| 2. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SSCs .....  | 9         |
| 2.1. <i>A citometria de fluxo como ferramenta de estudo</i> .....                                  | 9         |
| 2.2. <i>Caracterização fenotípica</i> .....  | 11        |
| 2.2.1. <i>O fenótipo SP – Side Population</i> .....  | 15        |
| 2.2.1.1. <i>O perfil de fluorescência</i> .....  | 18        |
| 2.3. <i>Caracterização funcional</i> .....   | 21        |
| 2.4. <i>MSCs de equino</i> .....   | 25        |
| 2.5. <i>SSCs no útero</i> .....  | 27        |
| 2.5.1. <i>Populações com características de SSCs no útero</i> .....                                | 28        |
| 3. CÉLULAS ESTAMINAIS ADULTAS: PAPEL EM PROCESSOS PATOLÓGICOS .....                                | 31        |
| 3.1. <i>Processos patológicos no útero</i> .....   | 33        |
| 4. O POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS SSCs .....  | 34        |
| 5. A ENDOMETROSE NA ÉGUA .....   | 36        |
| <b>III. TRABALHO DE INVESTIGAÇÃO .....</b>   | <b>39</b> |
| 1. OBJETIVOS .....   | 39        |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 40        |
| 2.1. <i>Isolamento de células do útero para obtenção de células do epitélio e do estroma</i> ..... | 40        |
| 2.2. <i>Coloração Hoechst</i> .....  | 41        |
| 2.3. <i>Isolamento das populações SP e NSP através de citometria de fluxo</i> .....                | 43        |
| 2.4. <i>Cultura de células SP e NSP a densidades celulares definidas</i> .....                     | 44        |
| 2.4.1. <i>Cultura em hipóxia e normóxia</i> .....  | 46        |
| 2.4.2. <i>Cultura em placa de 6 e 24 pocilhos</i> .....  | 46        |
| 3. RESULTADOS .....  | 47        |
| 3.1. <i>Isolamento de células endometriais</i> .....   | 47        |
| 3.2. <i>Identificação de células SP e NSP</i> .....  | 49        |
| 3.2.1. <i>Efeito da criopreservação na detecção de células SP</i> .....                            | 53        |
| 3.3. <i>Cultura de células SP e NSP</i> .....  | 53        |
| 3.3.1. <i>Cultura em hipóxia e em normóxia</i> .....   | 57        |
| 3.3.2. <i>Cultura em placa de 6 pocilhos e de 24 pocilhos</i> .....                                | 57        |
| 4. DISCUSSÃO .....   | 59        |
| 5. CONCLUSÃO .....   | 67        |
| 6. BIBLIOGRAFIA .....  | 69        |
| <b>ANEXO 1 .....</b>   | <b>85</b> |

## Lista de figuras

---

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 Classificação de células estaminais ilustrando o seu potencial de diferenciação.....  | 4  |
| Figura 2 Esquema dos mecanismos de divisão simétrica e assimétrica das células estaminais .....  | 7  |
| Figura 3 Ilustração do potencial de transdiferenciação de algumas células estaminais. ....   | 8  |
| Figura 4 Esquema dos principais componentes de um citômetro de fluxo. ....   | 10 |
| Figura 5 População SP da medula óssea.....   | 16 |
| Figura 6 Células da medula óssea incubadas com Hoechst e na ausência (esquerda) ou na presença (direita) de verapamil.....   | 19 |
| Figura 7 Indução de osteogênese, adipogênese e condrogênese. ....  | 23 |
| Figura 8 Algumas características de MSCs de equino adaptadas de diferentes trabalhos. ....   | 26 |
| Figura 9 Esquema de incubação dos diferentes tipos de amostra com Hoechst. ....  | 42 |
| Figura 10 Estratégia de criação de <i>gates</i> (janelas) usadas em citometria de fluxo. ....  | 44 |
| Figura 11 Esquema das placas de 24 pocilhos para cultura de células SP e NSP de estroma e epitélio a densidades celulares definidas. ....  | 45 |
| Figura 12 Esquema da placa de 6 pocilhos com as densidades celulares e as populações utilizadas. ....  | 46 |
| Figura 13 Número de células viáveis obtidas a partir do estroma e do epitélio distribuídas de acordo com a fase do ciclo éstrico .....   | 48 |
| Figura 14 Viabilidade celular média das células obtidas a partir do estroma e do epitélio nas diferentes fases do ciclo éstrico .....  | 49 |
| Figura 15 Comportamento da população SP na ausência (esquerda) ou na presença (direita) de verapamil. ....   | 50 |
| Figura 16 Amostra com padrão anormal de coloração .....  | 50 |
| Figura 17 Inversão da proporção de células SP esperada nas amostras emparelhadas na ausência (esquerda) e na presença (direita) de verapamil. ....   | 51 |
| Figura 18 Proporção de células SP obtidas a partir do epitélio e do estroma de acordo com a fase do ciclo éstrico.....   | 52 |
| Figura 19 Proporção de células SP obtidas a partir de diferentes populações celulares do endométrio distribuídas de acordo com a categoria de fibrose (Kenney, 1978).....  | 52 |
| Figura 20 Perfil das células SP numa amostra de células obtidas do epitélio logo após o seu isolamento ou após criopreservação. ....   | 53 |
| Figura 21 Evolução temporal da população SP obtida a partir do estroma e do epitélio de uma égua.. ..  | 55 |
| Figura 22 Observação microscópica da amostra de células NSP obtidas a partir do epitélio cultivada em hipóxia (A) ou normóxia (B).....   | 57 |
| Figura 23 Observação microscópica dos diferentes tipos celulares encontrados na cultura de células NSP obtidas a partir do endométrio .....  | 58 |
| Figura 24 Placa de 6 pocilhos após coloração com azul de toluidina. ....   | 58 |
| Figura 25 Padrão anormal das células obtidas a partir do epitélio (esquerda) comparado com o padrão de coloração Hoechst após cinco minutos de incubação (direita, adaptado de Ibrahim <i>et al.</i> , 2007). .... | 62 |



## Lista de tabelas

---

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 Marcadores de superfície usados no estudo de HSCs e MSCs. ....   | 12 |
| Tabela 2 Características de <i>Multipotent Mesenchymal Stromal Cells</i> e <i>Mesenchymal Stem Cells</i> . ....       | 14 |
| Tabela 3 Nomenclatura de algumas das proteínas ABC humanas e do murganho com a correspondente classificação ABC. .... | 20 |
| Tabela 4 Categorias de endometrose de acordo com Kenney (1978). ....  | 37 |
| Tabela 5 Escala de Kenney-Doig, adaptada de Snider <i>et al.</i> (2001). ....   | 38 |
| Tabela 6 Frações endometriais obtidas por amostra e posterior processamento. ....                                     | 41 |
| Tabela 7 Classificação da fase do ciclo éstrico e do grau de endometrose das amostras utilizadas. .                   | 47 |
| Tabela 8 Dados relativos à avaliação da população SP das diferentes frações do endométrio equino. ....                | 49 |
| Tabela 9 Condições utilizadas para as diferentes culturas. ....   | 54 |
| Tabela 10 Dados das culturas relativamente à presença de células de aspeto fibroblastóide.. ....                      | 56 |

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

---

|                     |   |
|---------------------|---|
| $\alpha$ -MEM       | <i>alpha modification of Minimum Essential Medium Eagle</i> |
| ASCs                | <i>Adult Stem Cells</i>                                     |
| AT                  | adenina-timina  |
| BMP                 | <i>bone morphogenetic protein</i>                           |
| bFGF                | <i>basic fibroblast growth factor</i>                       |
| BP                  | <i>band-pass</i>  |
| BrdU                | 5-bromo-2-deoxiuridina                                      |
| Cbfa-1              | <i>core binding factor alpha 1</i>                          |
| CCSs                | <i>Cancer Stem Cells</i>                                    |
| CD                  | <i>cluster of differentiation</i>                           |
| cél/cm <sup>2</sup> | células por centímetro quadrado                             |
| CFU                 | <i>colony forming unit</i>                                  |
| CIISA               | Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal  |
| Col1a1              | cadeia alfa 1 do colagénio tipo I                           |
| Col6a2              | cadeia alfa 2 do colagénio tipo VI                          |
| DMEM/F12            | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham</i> |
| DNA                 | <i>deoxyribonucleic acid</i>                                |
| ELISA               | <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>                    |
| ESCs                | <i>Embryonic Stem Cells</i>                                 |
| FABP4/aP2           | <i>fatty acid-binding protein-4</i>                         |
| FACS                | <i>fluorescence-activated cell sorting</i>                  |
| FBS                 | <i>fetal bovine serum</i>                                   |
| FGF                 | <i>fibroblast growth factor</i>                             |
| FMV-ULisboa         | Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa |
| GSCs                | <i>Germ Line Stem Cells</i>                                 |
| GPDH                | glicerol-2-fosfato desidrogenase                            |
| GT                  | <i>Generation Time</i>                                      |
| HBSS                | <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>                        |
| HSCs                | <i>Hematopoietic Stem Cells</i>                             |
| IGF                 | <i>insulin-like growth factor</i>                           |
| IBMX                | 3-isobutil-1-metil-xantina                                  |
| ISCT                | <i>International Society for Cellular Therapy</i>           |
| LPL                 | lipoproteína lipase   |
| LRC                 | <i>label-retaining cells</i>                                |

|                 |  |
|-----------------|--|
| MHC             | <i>Major Histocompatibility Complex</i>  |
| mRNA            | <i>messenger ribonuclein acid</i>  |
| MSCs            | <i>Mesenchymal Stem Cells ou Multipotent Mesenchymal Stromal Cells (ver capítulo 2.2 da Revisão Bibliográfica)</i> |
| NSCs            | <i>Neural Stem Cells</i>   |
| NSP             | <i>Non-Side Population</i>   |
| PBS             | <i>phosphate buffered saline</i>   |
| PDGF-R $\beta$  | <i>platelet-derived growth factor-receptor beta</i>  |
| PDT             | <i>Population Doubling Time</i>  |
| PMT             | <i>photomultiplier tube</i>  |
| PPAR $\gamma$ 2 | <i>peroxisome proliferation-activated receptor <math>\gamma</math>2</i>  |
| Q-FISH          | <i>quantitative fluorescence in situ hybridization</i>   |
| RT-PCR          | <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>   |
| Runx-2          | <i>runt-related transcription factor-2</i>   |
| SP              | <i>Side Population</i>   |
| SSCs            | <i>Somatic Stem Cells</i>  |
| SSC             | <i>Side Scatter</i>  |
| T3              | <i>triiodotironina</i>   |
| TA              | <i>transit amplifying</i>  |
| TNF             | <i>tumor necrosis factor</i>   |
| TGF- $\beta$    | <i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>   |

## I. RELATÓRIO DE ESTÁGIO

O estágio curricular decorreu entre o período de Abril de 2014 e Setembro de 2014 no Laboratório de Fisiologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa e no Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA). Foi durante este período que foram desenvolvidas as técnicas e trabalho experimental que são a base desta dissertação de Mestrado. Estas técnicas estiveram principalmente relacionadas com cultura de células e seu manuseamento, incluindo o seu isolamento a partir de órgãos, a sua cultura e criopreservação. A monitorização celular foi uma competência bastante trabalhada, tanto de células em cultura como para análise de viabilidade. Foi efectuada, em geral semanalmente, a coloração de células para citometria de fluxo com Hoechst 33342. Para além destas técnicas, durante a parte final do estágio foram ainda aplicadas várias técnicas de colheita de RNA (*ribonucleic acid*) das células em cultura. Ocasionalmente, foram acompanhadas técnicas de imunofluorescência e ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*). Este período de estágio permitiu-me não só ganhar bastante conhecimento e experiência numa área pouco abordada durante o curso, como ganhar as competências necessárias para continuar a trabalhar neste projecto por mais algum tempo após o fim do tempo de estágio. Todo este conhecimento não teria sido adquirido sem a ajuda da minha companheira de trabalho, Cátia Sofia de Sousa Pereira, da Professora Dr.<sup>a</sup> Maria Rosa Rebordão Cordeiro Simões Crisóstomo e da Dr.<sup>a</sup> Ana Amaral e o apoio da minha orientadora, a Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias.

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Células estaminais: uma introdução

---

As células estaminais são células com capacidade de autorrenovação e de diferenciação em diferentes e vários tipos de células e tecidos; assim, têm capacidade de regenerar um tecido sem alteração da sua função (Can, 2008; Gattegno-Ho, Argyle, & Argyle, 2012; Herzog, Chai, & Krause, 2003; Roobrouck, Ulloa-Montoya, & Verfaillie, 2008). Estas e outras características fazem com que sejam alvo de estudo, especialmente no campo da Medicina Regenerativa e Engenharia de Tecidos. Em Medicina Veterinária, é a Medicina Desportiva de Equinos a que mais tem procurado avanços nesta área numa tentativa de melhorar as capacidades intrínsecas de reparação de cartilagem, osso, tendões e ligamentos (De Schauwer, Meyer, Van de Walle, & Van Soom, 2011; Juopperi, 2012; Koch, Berg, & Betts, 2009; Kol *et al.*, 2013). No entanto, as células estaminais podem ser ferramentas úteis em muitas outras situações, como na criação de modelos de doenças e estudo de processos patológicos, desenvolvimento de biomarcadores e estudo de fármacos e de toxicidade (Juopperi, 2012).

#### 1.1. Classificação de células estaminais

---

As células estaminais podem ser classificadas de acordo com a sua origem ou com a sua capacidade de diferenciação. Nos animais, considera-se que as células estaminais podem ter origem embrionária ou não embrionária (Koch *et al.*, 2009). Num estadio inicial de desenvolvimento embrionário (mórula), as células são totipotentes, capazes de originar todas as células do organismo e os anexos fetais (De Schauwer *et al.*, 2011). De acordo com a definição mais frequente, consideram-se as células estaminais embrionárias, *Embryonic Stem Cells* (ESCs), como as células presentes na massa celular interna do blastocisto, dando origem às três camadas embrionárias: endoderme, mesoderme e ectoderme (Gattegno-Ho *et al.*, 2012). São consideradas células pluripotentes por se conseguirem diferenciar em células derivadas de qualquer uma destas três camadas embrionárias e em células da linha germinativa (Can, 2008; De Schauwer *et al.*, 2011; Gattegno-Ho *et al.*, 2012). Uma das vantagens que se considera relativamente às células estaminais não embrionárias é, pela sua precocidade, a incapacidade de reconhecimento imunológico por parte do receptor (Gattegno-Ho *et al.*, 2012).

As células estaminais não embrionárias são consideradas células estaminais adultas, *Adult Stem Cells* (ASCs). Dentro destas, podem pertencer à linha germinativa ou à linha somática

(De Schauwer *et al.*, 2011). Estas últimas são as mais frequentes na literatura e denominam-se células estaminais somáticas (*Somatic Stem Cells*, SSCs). São consideradas células multipotentes, uma vez que se podem diferenciar em células derivadas da sua camada embrionária de origem. No entanto, os conceitos da potencialidade celular podem não ser tão claros *in vivo* como na teoria: por exemplo, recentemente foi sugerido que estas células, teoricamente multipotentes, se conseguem diferenciar em células derivadas de outras camadas embrionárias que não aquela da qual são originárias, dando origem ao conceito de “plasticidade celular” (Cervelló & Simón, 2009; De Schauwer *et al.*, 2011; Gattegno-Ho *et al.*, 2012; Wagers & Weissman, 2004). A nível embrionário, as SSCs são responsáveis pela organogénese, enquanto que a linha celular das células estaminais germinativas (*Germ Line Stem Cells*, GSCs) é responsável pela gametogénese (Li & Xie, 2005).

As SSCs constituem subpopulações no estado quiescente e foram identificadas através das suas propriedades funcionais em vários tecidos e órgãos adultos. São responsáveis pela manutenção da homeostasia dos tecidos e órgãos, originando células que substituem outras células mortas ou envelhecidas, tanto devido à renovação celular natural do tecido como a lesões neste (Gargett & Masuda, 2010; Li & Xie, 2005). A proliferação e diferenciação destas células são consideradas como o mecanismo mais comum de regeneração tecidual tanto em animais como em humanos (Gattegno-Ho *et al.*, 2012).

Dentro das SSCs foram identificadas diferentes subpopulações, muitas vezes denominadas de acordo com o seu tecido de origem, estando algumas esquematizadas na Figura 1. As mais caracterizadas são as células estaminais hematopoiéticas (HSCs, *Hematopoietic Stem Cells*), que se diferenciam em todas as células do sangue, conseguem autorrenovar-se *in vivo* e tornar funcional o sistema hematopoiético de um paciente com ablação da medula (Roobrouck *et al.*, 2008). Outras SSCs identificadas foram as células estaminais neurais (NSCs, *Neural Stem Cells*), que originam neurónios, astrócitos e oligodendrócitos, e as células estaminais mesenquimais (abreviadas como MSCs, de *Mesenchymal Stem Cells*, mas cujo acrónimo origina ambiguidades na literatura, como explicado no capítulo 2.2), as quais se conseguem diferenciar em fibroblastos, adipócitos, osteoblastos, condrócitos e células do músculo esquelético (Roobrouck *et al.*, 2008). Epiderme, intestino, pulmão, fígado, pâncreas, coração, cérebro, músculo esquelético, retina e sangue do cordão umbilical são outros dos tecidos onde se identificaram SSCs (Can, 2008; Wagers & Weissman, 2004). SSCs também foram encontradas no endométrio humano e murino (Gargett & Masuda, 2010). Outras linhas estaminais que apenas se conseguem diferenciar num tipo de célula foram identificadas Roobrouck *et al.* (2008), nomeadamente na córnea, no endotélio e no testículo. As células-mãe epiteliais da córnea, as células endoteliais e as células-satélite do músculo, são unipotentes, ou seja, originam apenas um tipo de célula

madura e estão restritas a uma linhagem (Can, 2008). Estes dados sugerem que grande parte dos tecidos adultos contém potencialmente uma população de SSCs (Cervelló & Simón, 2009).

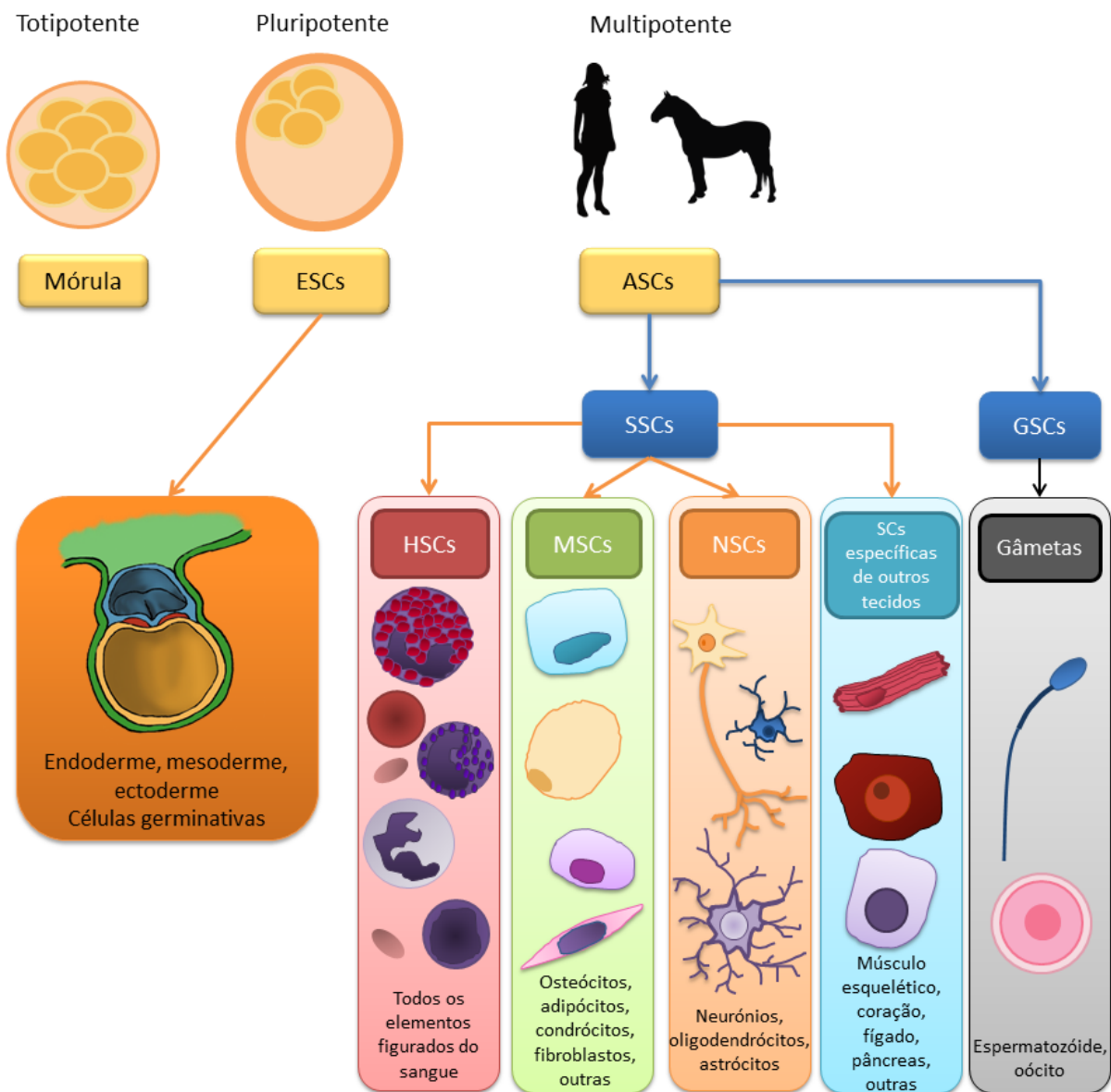


Figura 1 Classificação de células estaminais ilustrando o seu potencial de diferenciação. Adaptado de Bongso & Lee (2005).

ESCs – *Embryonic Stem Cells*; ASCs – *Adult Stem Cells*; SSCs – *Somatic Stem Cells*; GSCs – *Germ Line Stem Cells*; HSC – *Hematopoietic Stem Cells*; MSCs – *Mesenchymal Stem Cells*; NSCs – *Neural Stem Cells*.

Os conceitos teóricos deparam-se com alguns obstáculos com a sua aplicação *in vivo*. Os estudos de ESCs incidem particularmente em células de murganho, devido às implicações éticas da utilização de ESCs humanas, e os conhecimentos obtidos podem não ser extrapoláveis entre espécies. Apesar de as ESCs se poderem multiplicar indefinidamente *in vitro* e poderem ter um potencial mais amplo que as ASCs, o seu uso em terapias celulares pode também levar à formação de tecidos heterotópicos (teratomas), sendo as ASCs

consideradas não-tumorigénicas (Gattegno-Ho *et al.*, 2012; Tuan, Boland, & Tuli, 2003). Por outro lado, muitas vezes o termo “célula estaminal” é usado em populações caracterizadas pela sua capacidade de autorrenovação e diferenciação, sem avaliação fenotípica. Torna-se importante uma definição correta das características celulares antes de se atribuir a definição “estaminal”, o que não é fácil devido à inexistência de marcadores específicos para células estaminais (Bongso & Lee, 2005; De Schauwer *et al.*, 2011).

## 1.2. O nicho de células estaminais

---

Após o nascimento, as SSCs e as GSCs permanecem nos órgãos e tecidos do organismo nos denominados “nichos de células estaminais”. Estes nichos correspondem ao microambiente em que estão envolvidas e que influencia o balanço entre renovação e diferenciação celular, tendo sido Schofield, em 1978, a propor esta denominação (Li & Xie, 2005; Mohyeldin, Garzón-Muvdi, & Quiñones-Hinojosa, 2010). Para além deste microambiente, existem também programas genéticos intrínsecos responsáveis pelo controlo destas capacidades, sendo ambos fatores essenciais na regulação das células estaminais (Li & Xie, 2005).

Segundo Li e Xie (2005), apesar de inicialmente o “nicho” se referir à localização das células estaminais, este deve ser considerado como o conjunto de componentes celulares e sinais celulares presentes no microambiente junto das células estaminais.

### 1.2.1. Caracterização do nicho de células estaminais

---

O nicho de células estaminais varia em localização e características nos diferentes tecidos e órgãos. Nos mamíferos, a sua complexidade torna difícil esta caracterização, pelo que a utilização de outros modelos se torna vantajosa. Na *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* foram identificadas e caracterizadas GSCs e o seu nicho por diversas equipas científicas, especialmente em termos de vias moleculares reguladoras (Li & Xie, 2005). Este trabalho foi um suporte importante na identificação do nicho de células estaminais em sistemas de mamíferos. Apesar das diferenças encontradas, os estudos efetuados em mamíferos e não mamíferos demonstraram a existência de características comuns a todos os nichos (Li & Xie, 2005).

A estrutura geral do nicho é variável e este pode ser composto por mais que um tipo celular. No entanto, tem uma localização específica para manutenção das células estaminais. Uma das suas funções é servir de suporte físico para as células estaminais, tendo-se detetado moléculas responsáveis pela adesão celular nos modelos estudados. Outra função é a



produção de moléculas sinalizadoras responsáveis pela regulação das células estaminais em termos do seu número e comprometimento relativamente a uma certa linha celular. A nível da medula óssea, onde existem duas populações estaminais (as HSCs e as MSCs), existem trabalhos que sugerem que é necessário um certo grau de interação inicial célula-célula para se obter diferenciação osteogénica do estroma (Friedenstein, Piatetzky-Shapiro, & Petrakova, 1966) e que a diferenciação na linha hematopoiética ocorre na presença de osso ou estroma do baço, mas que na ausência de tecido ósseo a população medular apresenta potencial osteogénico (Friedenstein *et al.*, 1966). Por outro lado, alguns autores também sugerem que os adipócitos e células reticuladas que expressam fosfatase alcalina encontrados no estroma da medula óssea podem ser fenótipos diferentes condicionados pelo microambiente medular (Deans & Moseley, 2000).

Verificou-se que a estrutura do nicho é assimétrica, isto é, quando ocorre divisão celular, uma das células-filha permanece no nicho como célula estaminal (ou seja, exibe características de autorrenovação) enquanto que a outra célula-filha sai do nicho para proliferar e diferenciar-se, tornando-se numa célula madura funcional (Cervelló & Simón, 2009; Li & Xie, 2005). Este processo, em condições fisiológicas, é irreversível (Li & Xie, 2005).

### 1.3. Mecanismo de divisão e organização

---

As células estaminais têm um mecanismo de divisão simétrica, originando células-filhas idênticas, mas, como referido anteriormente, também possuem capacidade de realizar divisão assimétrica no nicho de células estaminais, sendo esta a responsável pela sua capacidade de autorrenovação (Gattegno-Ho *et al.*, 2012). Por divisão assimétrica uma célula estaminal origina uma célula-filha que permanece como célula estaminal no nicho – mantendo a sua capacidade de multiplicação e características estaminais – e uma célula-filha com capacidade limitada de autorrenovação, que se diferenciará (Cervelló & Simón, 2009; Gattegno-Ho *et al.*, 2012). Esta última célula-filha é denominada “*transit amplifying cell*” (célula TA) (Cervelló & Simón, 2009). São células com características intermédias relativamente às células estaminais e às células diferenciadas. Este mecanismo de divisão encontra-se esquematizado na Figura 2. Assim, o progresso em termos de organização das células estaminais num determinado tecido ou órgão tem três fases: a primeira corresponde à divisão lenta que ocorre no nicho; a segunda corresponde à população de células TA, que passam por vários ciclos de proliferação celular e vão adquirindo marcadores de diferenciação, originando finalmente células diferenciadas que constituem a população que surge na terceira fase, em que também já não existe capacidade de multiplicação celular

(Cervelló & Simón, 2009). Como anteriormente referido, os sinais do nicho celular são também responsáveis pela linha de diferenciação resultante (Gattegno-Ho *et al.*, 2012).

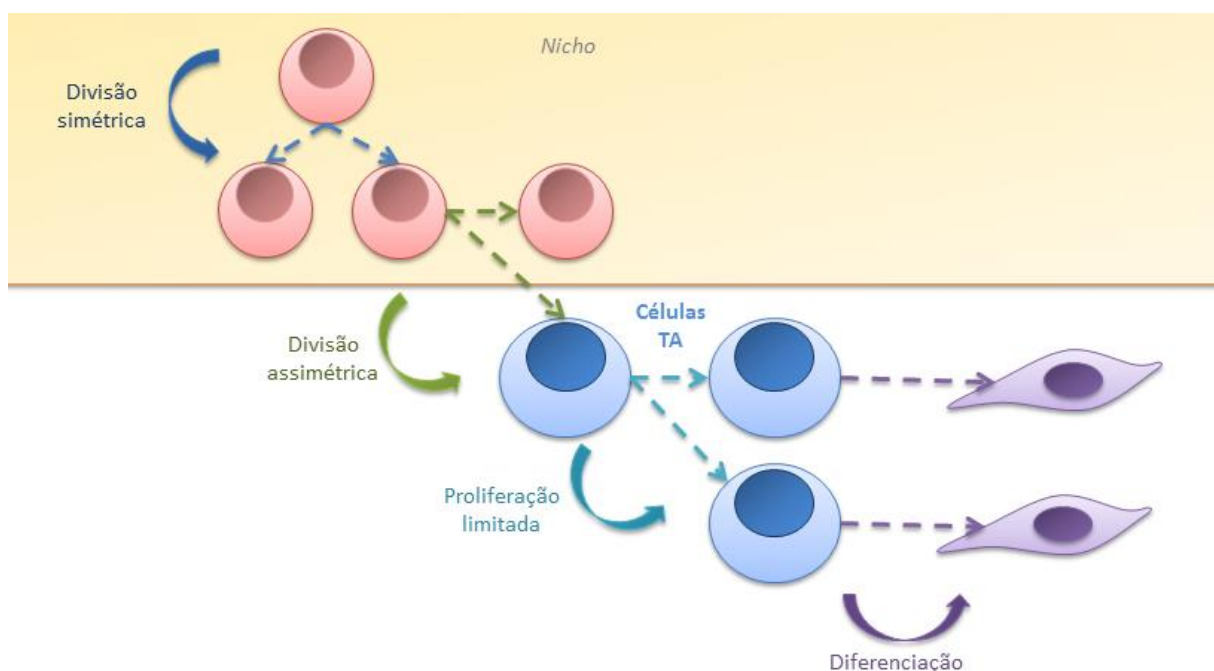


Figura 2 Esquema dos mecanismos de divisão simétrica e assimétrica das células estaminais. Adaptado de Gattegno-Ho *et al.* (2012).

#### 1.4. O conceito de plasticidade celular

Apesar de se considerarem as SSCs como células multipotentes, estudos recentes levaram ao aparecimento do conceito de “plasticidade celular” ou “transdiferenciação”. No entanto, este fenómeno não foi ainda estudado em profundidade de maneira a perceber se as células apresentam uma verdadeira capacidade de transdiferenciação, exibindo fenótipos não esperados de acordo com a sua origem embrionária, ou se esta alteração fenotípica a nível tecidual se deve a fenómenos de fusão celular (De Schauwer *et al.*, 2011; Wagers & Weissman, 2004). Uma célula multipotente deveria diferenciar-se em linhas celulares derivadas da sua camada embrionária de origem, no entanto existem cada vez mais estudos que desafiam esta teoria e que levantam a hipótese de que a linhagem de uma célula estaminal pode não ser rigidamente definida, mas ser adaptável aos sinais recebidos do microambiente (Wagers & Weissman, 2004). Como referido por Caplan e Bruder (2001), foi possível obter hepatócitos a partir de HSCs (Lagasse *et al.*, 2000), elementos sanguíneos a partir das células-satélite do músculo (as células estaminais do músculo) (Jackson, Mi, & Goodell, 1999) e populações celulares da glia a partir de MSCs (Azizi, Stokes, Augelli, DiGirolamo, & Prockop, 1998). Também é possível obter células progenitoras pancreáticas a

partir de MSCs (Di Gioacchino *et al.*, 2005; Vater, Kasten, & Stiehler, 2011), bem como células endoteliais e cardiomiócitos (Reyes *et al.*, 2001; Tuan *et al.*, 2003). Em vários trabalhos usando frações ricas em HSCs surgem descendentes não hematopoiéticos destas em tecidos e órgãos como pele, epitélio pulmonar, intestinal e renal, parênquima hepático, pâncreas, músculo esquelético, endotélio, miocárdio e neurónios do sistema nervoso central, embora outros estudos reportem a não detecção desta progenia mesmo em modelos de lesão tecidular (como revisto por Wagers & Weissman, 2004).

O conceito de plasticidade celular está relacionado com esta capacidade de originar células de outras linhas celulares, assumindo fenótipos funcionais diferentes daqueles determinados pelo tecido onde estão e pela sua origem embriológica (Herzog *et al.*, 2003). Esta capacidade estaria relacionada com o importante papel que os sinais do nicho têm na orientação da diferenciação celular das células estaminais (Tuan *et al.*, 2003).

No entanto, verificou-se já que num dos trabalhos em que as HSCs se diferenciaram em cardiomiócitos que esta “transdiferenciação” foi na verdade devida a fenómenos de fusão celular, mantendo-se a controvérsia sobre a real capacidade de células estaminais de ultrapassarem estes limites de linhagem (Bianco, Robey, & Simmons, 2008; Keating, 2012).

Alguns exemplos de capacidade de plasticidade estão ilustrados na Figura 3.

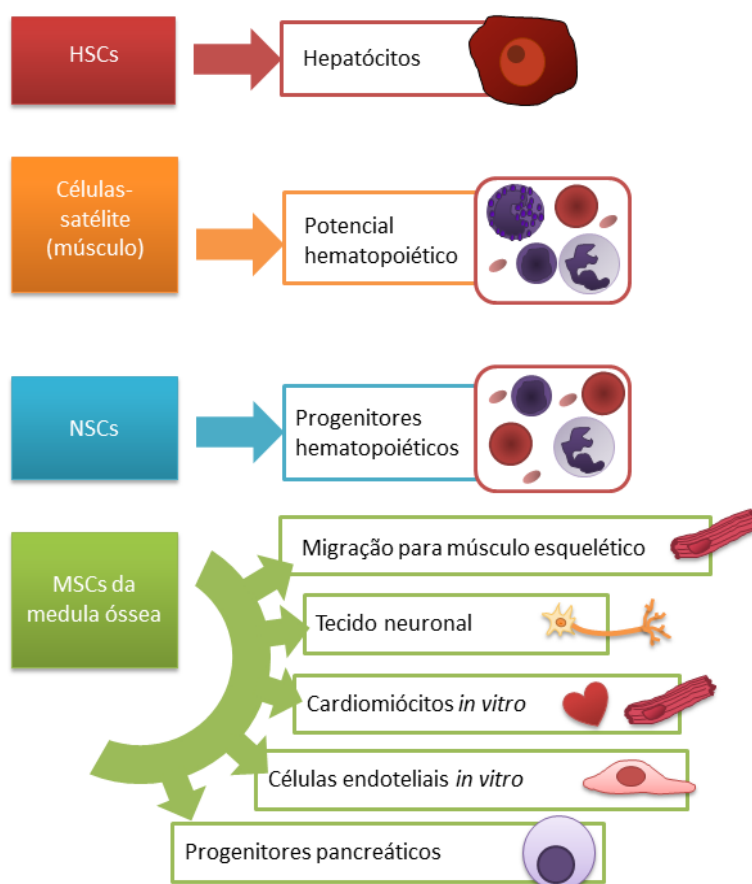


Figura 3 Ilustração do potencial de transdiferenciação de algumas células estaminais. Adaptado de Tuan *et al.* (2003).

## 2. Identificação e caracterização de SSCs

---

De todas as SSCs, as HSCs são as melhor caracterizadas, mas a população atualmente mais em foco nos trabalhos de investigação em equinos é a população das MSCs. No entanto, a descoberta e investigação das MSCs tem uma ligação às HSCs, já que ambas são originárias dos órgãos hematopoiéticos e existem indícios de que partilham o mesmo nicho (Deans & Moseley, 2000; Gronthos, Graves, Ohta, & Simmons, 1994; Lepperdinger, 2011).

A identificação e localização das SSCs nos tecidos e órgãos é dificultada pela falta de marcadores específicos em termos morfológicos e bioquímicos (Cervelló & Simón, 2009). Para se poderem estudar estas populações é primeiro necessário obtê-las a partir dos tecidos e obter frações ricas em células potencialmente estaminais. Esta purificação pode ser obtida através da análise de combinações de antigénios tidos como tipicamente presentes ou ausentes na superfície de células com características estaminais por citometria de fluxo, ainda que as populações resultantes não sejam homogéneas em termos de propriedades estaminais (Challen & Little, 2006). Outra estratégia usada mais recentemente consiste na obtenção de uma população celular que apresenta o fenótipo SP (*Side Population*). Após obtenção das células, os estudos *in vitro* e *in vivo* permitem a sua caracterização funcional e fenotípica, mas o facto de não existir uma maneira definitiva de seleccionar as células estaminais (especialmente MSCs) torna a comparação dos estudos posteriores complicada por se referirem a populações potencialmente diferentes.

### 2.1. A citometria de fluxo como ferramenta de estudo

---

A citometria de fluxo consiste numa técnica de análise celular em que uma dada população é estudada célula a célula relativamente a vários parâmetros obtidos pela sua passagem através de um feixe de laser.

Existem vários componentes num citómetro, esquematizado na Figura 4. O termo “*fluidics system*” é utilizado para referir o componente que permite que as células da suspensão celular sejam passadas uma a uma pelo feixe de laser. Este laser é um dos principais componentes do aparelho e tipicamente emite radiação com comprimento de onda de 488 nm (azul). No entanto, existem vários tipos de laser que podem emitir luz ultravioleta (comprimento de onda entre os 360 e 400 nm), vermelha (635 nm) ou amarela (561 nm) e podem ser usados em simultâneo. Torna-se importante conhecer qual o laser ou os lasers de um determinado aparelho, pois, caso se queiram estudar células marcadas com fluorocromos, estes devem ser excitáveis pelo comprimento de onda emitido pelo laser, de maneira a se obter fluorescência. Para receber o sinal luminoso existe um sistema de óticas

que o filtra e direciona para diferentes detetores. Finalmente, o sistema computacional transforma o sinal luminoso num sinal digital passível de ser analisado por um programa apropriado (Davis, Wilkerson, & Rush, 2002; Rahman, 2014).

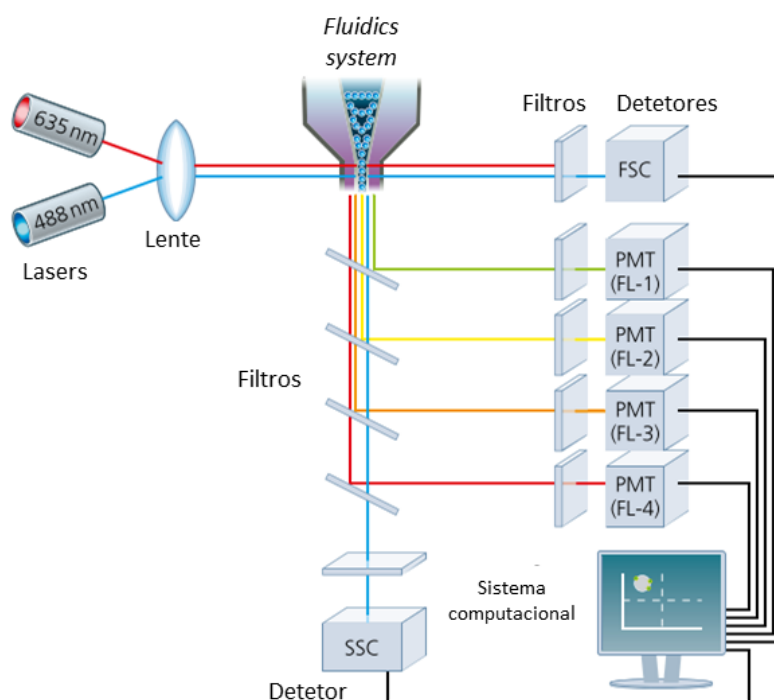


Figura 4 Esquema dos principais componentes de um citômetro de fluxo. Adaptado de Rahman (2014).

Quando uma partícula (denominada em inglês “*event*”) passa pelo feixe de laser, interrompe-o e a luz é difundida em várias direções. Os detetores captam a luz difundida na direção do trajeto do feixe de laser, a *forward scatter* (abreviada como FSC), bem como a luz emitida perpendicularmente ao trajeto do laser, a *side scatter* (abreviada como SSC). Os detetores tipo fotomultiplicadores (abreviados como PMT, de *photomultiplier tube*) são mais frequentemente usados para a SSC e para a radiação fluorescente por serem mais sensíveis (Rahman, 2014). Em termos celulares, a FSC está relacionada com o tamanho da célula: células com tamanhos maiores interrompem o feixe de radiação em maior grau, resultando em maior FSC. Assim, este parâmetro pode ser utilizado para estudar o tamanho celular. Por outro lado, a luz difundida perpendicularmente está relacionada com a complexidade celular e granularidade das células – quanto mais complexa e com mais grânulos, maior a radiação difundida e, conseqüentemente, os valores de SSC. É também perpendicularmente ao trajeto do feixe laser que estão os espelhos e filtros responsáveis pela detecção da fluorescência. O conjunto de espelhos e filtros permite direcionar os comprimentos de onda fluorescentes para os sistemas de detecção de maneira individual. Existem três tipos de filtros: filtros *short-pass*, transmitindo radiação com menos de um certo comprimento de onda; filtros *band-pass*, que transmitem um espectro definido de

comprimentos de onda, e filtros *long-pass*, que transmitem radiação acima de determinado comprimento de onda (Davis *et al.*, 2002; Rahman, 2014). Os filtros *band-pass* são frequentemente indicados como “630/15 nm”, indicando que captam radiação com uma amplitude de 15 nm relativamente ao valor central de 630 nm (neste caso o filtro captaria radiação com comprimento de onda dos 615 aos 645 nm). Quando filtros *long-pass* são colocados em ângulo são denominados espelhos dicróicos (e, por vezes, *beam splitters*), pois deixam passar radiação acima de um certo comprimento de onda, refletindo a restante radiação noutra direção. A utilização destes filtros é frequente na separação e direcionamento de diferentes comprimentos de radiação para os despectivos detetores (Rahman, 2014).

O objetivo da análise de citometria de fluxo aplicada a células é que as partículas analisadas consistam em células individuais. Para tal, usam-se estratégias de *gating*, que consistem na seleção de eventos de interesse, por exemplo, criando janelas (denominadas de “*gates*” em inglês) que fazem exclusão de detritos celulares ou de células mortas, associando frequentemente janelas consecutivas. Por exemplo, a adição de iodeto de propídio, um corante fluorescente que se liga aos ácidos nucleicos mas não atravessa membranas celulares intactas, permite excluir células mortas da seleção baseando-se num aumento da fluorescência vermelha intracelular (Alvarez-Barrientos, Arroyo, Cantón, Nombela, & Sánchez-Pérez, 2000; Belloc *et al.*, 1994). Muitos citómetros, para além da capacidade de análise de vários parâmetros em simultâneo (FSC, SSC, informação dos detetores de fluorescência) são ainda capazes de separar as células de acordo com determinadas características seleccionadas através da aplicação de várias janelas. Esta operação permite a recolha de células que expressam essas características, sendo extremamente útil para a obtenção de diferentes subpopulações a partir de uma população heterogénea inicial (Davis, Wilkerson, & Rush, 2002). A utilização de corantes fluorescentes para separar células consiste numa técnica denominada *fluorescence-activated cell sorting* (FACS), permitindo separar células consoante o seu nível de fluorescência.

Esta técnica é muito utilizada tanto na caracterização como no enriquecimento de populações potencialmente estaminais, especialmente através da imunofenotipagem e da mais recente técnica “SP” (*Side Population*), aprofundadas nos capítulos seguintes.

## **2.2. Caracterização fenotípica**

---

O estudo fenotípico das células estaminais baseia-se na análise de proteínas e genes expressos, bem como de citocinas (especialmente relacionadas com MSCs) (Azouna *et al.*, 2012; Caplan, 2007). A imunofenotipagem é normalmente efetuada por citometria de fluxo e

foca-se muitas vezes em moléculas pertencentes ao grupo “*cluster of differentiation*” (CD). Estas moléculas funcionam na sua maioria como recetores ou ligandos, ou então estão envolvidas nas vias de sinalização celular, de reconhecimento ou de apresentação de antígenos (De Schauwer *et al.*, 2011). É possível consultar no anexo 1 uma lista de algumas das moléculas estudadas e da sua função. Uma vez que até ao momento não existe um marcador de superfície específico para células estaminais, é frequente utilizar uma combinação de vários marcadores que podem estar presentes ou ausentes nas populações em estudo. Para as HSCs, uma população de HSCs purificada que expresse CD34 na superfície celular é capaz de regenerar tanto *in vivo* como *in vitro* todas as células hematopoiéticas (Caplan & Bruder, 2001).

A Tabela 1 refere alguns dos marcadores mais frequentemente usados em estratégias de enriquecimento e caracterização de HSCs e MSCs.

Tabela 1 Marcadores de superfície usados no estudo de HSCs e MSCs.

| Linhagem    | Marcadores presentes  | Marcadores ausentes  |
|-------------|---|--|
| <b>HSCs</b> | CD34<br>CD105 (SH2) (murganho)<br>CD133<br>Thy-1 (CD90) (murganho)<br>Sca-1 (murganho)<br>c-kit (CD117) | Lin (vários marcadores de linhagens hematopoiéticas diferenciadas)<br>CD38<br>CD45RA<br>CD71 |
| <b>MSCs</b> | CD44<br>CD73<br>CD90<br>Stro-1<br>CD105   | CD11<br>CD14<br>CD11b<br>CD34<br>CD45<br>CD19<br>CD79<br>HLA-DR                              |

No caso das MSCs não existe um único marcador de superfície, embora desde 2006 tenha sido elaborado pela Sociedade Internacional para a Terapia Celular (ISCT, *International Society for Cellular Therapy*) um painel com marcadores que devem estar presentes ou ausentes nas populações celulares humanas para que estas possam ser consideradas como MSCs, bem como algumas das propriedades funcionais que devem possuir. Como esquematizado na Tabela 2, as MSCs devem expressar os marcadores de superfície CD73,

CD90 e CD105, não expressando CD14 (ou CD11b), CD34, CD45, CD79 $\alpha$  (ou CD19) nem MHC-II. O termo *mesenchymal stem cells* (células estaminais mesenquimais) comumente utilizado deve também ser substituído pelo termo *multipotent mesenchymal stromal cells* (MSCs, células multipotentes mesenquimais do estroma) quando se refere a uma população de células que aderem ao plástico quando em cultura, expressam os marcadores anteriormente referidos e têm potencial de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (De Schauwer *et al.*, 2011; Dominici *et al.*, 2006; Horwitz *et al.*, 2005; Koch *et al.*, 2009). O termo “célula estaminal mesenquimal”, deve ser reservado para uma subpopulação dessas células que demonstre também capacidade de sobrevivência a longo prazo *in vivo*, capacidade de autorrenovação e capacidade de repopulação tecidual associada a diferenciação em várias linhas celulares. Esta definição pode ser demasiado restritiva, já que as potenciais MSCs isoladas em diferentes tecidos parecem ter características diferentes e estas também variam entre espécies (Keating, 2012). Apesar das recomendações da ISCT, a questão dos marcadores de MSCs é tão incongruente que uma revisão de vários trabalhos efetuados após esse período revela que 49 marcadores diferentes foram estudados (Penny, Harris, Shakesheff, & Mobasheri, 2012). Para o caso dos equinos foi proposto um painel semelhante ao da ISCT (De Schauwer *et al.*, 2011), também esquematizado na Tabela 2.

O maior obstáculo na imunofenotipagem das células de equinos é a limitada disponibilidade de anticorpos monoclonais específicos da espécie ou com reatividade cruzada (De Schauwer *et al.*, 2011). De 379 anticorpos monoclonais, apenas 14 destes apresentaram reações cruzadas do tipo celular (De Schauwer *et al.*, 2011; Ibrahim, Saunders, Kydd, Lunn, & Steinbach, 2007). Para além dos 379 anticorpos usados neste estudo, outros 115 foram posteriormente testados, sendo que 16 mostraram reação positiva (Ibrahim & Steinbach, 2007). Mais recentemente, 30 anticorpos monoclonais foram validados no reconhecimento de epítomos equinos, tendo apenas onze deles reagido com os epítomos equinos correspondentes (De Schauwer *et al.*, 2012). Num outro estudo desenvolvido, um anticorpo específico de murganho contra CD90 de rato mostrou reação cruzada com células de equinos (Dhar *et al.*, 2012). Embora muitas equipas reportem resultados contraditórios, em geral as MSCs nos equinos aparentam ser positivas para o marcador CD90 e negativas para o CD34 (Penny *et al.*, 2012). Os marcadores CD29 e CD44 são também sugeridos por De Schauwer *et al.* (2011) para caracterizar as *multipotent mesenchymal stromal cells* de equinos por ser possível o reconhecimento dos epítomos específicos de equino.



Tabela 2 Características de *Multipotent Mesenchymal Stromal Cells* e *Mesenchymal Stem Cells*.

|   | Multipotent Mesenchymal Stromal Cells  |        | Mesenchymal Stem Cells<br><br>(humano)   |
|---|--|--------|--|
|   | Equino   | Humano |  |
| Características em cultura  | Células aderentes ao plástico  |        | Características das Multipotent Mesenchymal Stromal Cells humanas<br><br>+<br><br>Longa capacidade de sobrevivência <i>in vivo</i><br><br>Capacidade de autorrenovação<br><br>Capacidade de repopulação tecidual com diferenciação em múltiplas linhas celulares |
| Potencial de diferenciação  | Diferenciação in vitro em linhas osteogénica, condrogénica e adipogénica usando condições padrão |        |  |
| Expressão de marcadores de superfície   | CD29   | CD73   |  |
|   | CD44   | CD105  |  |
|   | CD90   | CD90   |  |
| Ausência de expressão de marcadores de superfície                                   | CD14   | CD14   |  |
|   | CD79α  | CD34   |  |
|   | MHC-II   | CD45   |  |
|   |  | CD79α  | MHC-II   |
| Expressão de outros marcadores de superfície (complementar à classificação da ISCT) | CD29   | CD29   |  |
|   | CD29   | CD44   |  |
|   | CD44   | CD106  |  |
|   |  | CD166  |  |

A expressão de genes a nível de mRNA (*messenger ribonucleic acid*) é uma técnica regularmente empregue para caracterização fenotípica, estudando-se, por exemplo, marcadores de pluripotência conhecidos para ESCs, como é o caso de fatores de transcrição como Oct4, Sox2 e Nanog. Estes fatores de transcrição consistem em proteínas que se ligam ao DNA controlando a transcrição dos genes através da sua inibição ou

expressão, assim permitindo suprimir genes de diferenciação e manter a capacidade de pluripotência (De Schauwer *et al.*, 2011). No anexo 1 é encontrada uma tabela para consulta relativamente às características destes fatores de transcrição. No caso dos equinos, os glicolípidos SSEA-1, SSEA-3 e SSEA-4 e os antígenos Tra-1-160 e Tra-1-81 foram estudados em MSCs, mas os resultados são contraditórios, tendo alguns grupos reportado a sua deteção e outros a sua ausência (De Schauwer *et al.*, 2011). Ainda que a alteração da expressão de um gene a nível mRNA não signifique que existam alterações significativas a nível de expressão proteica, a análise de expressão de genes através do mRNA pode ser bastante útil, especialmente na ausência de anticorpos apropriados, como no caso dos equinos (Radcliffe, Flaminio, & Fortier, 2010).

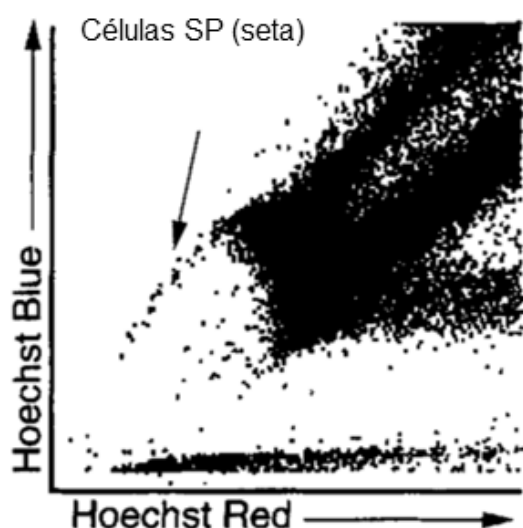
As SSCs existem no nicho num estado quiescente, pelo que é de esperar que sofram poucas divisões celulares. Assim, uma equipa de investigadores propôs que a avaliação do comprimento dos telómeros num determinado tecido pudesse auxiliar na deteção de SSCs, sendo estas a que tinham um comprimento de telómeros relativo maior. Os telómeros são estruturas nucleoproteicas que protegem as extremidades dos cromossomas da degradação do DNA e o seu comprimento é mantido pela enzima telomerase, a qual adiciona repetições teloméricas após cada divisão celular, embora a sua atividade não seja suficiente para inibir a perda progressiva do comprimento dos telómeros devida à idade. Através da técnica de hibridização fluorescente quantitativa *in situ* (Q-FISH, de *quantitative fluorescence in situ hybridization*) foi possível determinar a existência de gradientes de comprimento de telómeros dentro de um mesmo tecido (Flores *et al.*, 2008). Verificou-se também que as regiões com telómeros maiores correspondiam aos compartimentos de células estaminais da pele, intestino delgado, testículos, córnea e cérebro de ratinho. Este mesmo trabalho demonstrou que o encurtamento dos telómeros nas células estaminais estava relacionado com o envelhecimento do organismo, sugerindo que estas alterações poderão contribuir para esse processo através de disfunção do compartimento estaminal (Alt *et al.*, 2012; Flores *et al.*, 2008). Uma vez que a telomerase está relacionada com a restituição dos telómeros, outra alternativa usada por outras equipas consiste na medição da sua atividade (Cervelló & Simón, 2009).

### 2.2.1. O fenótipo SP – *Side Population*

---

Os ensaios para determinação da *Side Population* são ensaios funcionais baseados num processo biológico ativo que ocorre no interior das células com o corante Hoechst33342 (Petriz, 2007). Este corante, também referido como Ho342, H 33342 ou bisbenzimidaz, é um corante vital que se liga ao DNA, especificamente às regiões na molécula de dupla cadeia ricas em AT (adenina-timina). Pode, assim, ser usado para estudar o ciclo celular (Goodell,

Brose, Paradis, Conner, & Mulligan, 1996; Petriz, 2007). O Hoechst é um corante fluorescente que tem um pico de absorção aos 346 nm de comprimento de onda e emissão máxima aos 460 nm (comprimento de onda azul), mas possui emissão ainda na região da radiação vermelha (Petriz, 2007). Quando Goodell e colaboradores (1996) estudaram HSCs, verificaram que as células da medula óssea apresentavam um padrão de fluorescência atípico e complexo quando eram avaliadas simultaneamente nas duas emissões de fluorescência do Hoechst. Havia uma subpopulação com baixa emissão de fluorescência tanto no comprimento de onda vermelho como azul, facilmente destacável da restante população celular e que se verificou ser rica em células com marcadores celulares associados a HSCs. Esta população celular localizada na periferia da população principal foi denominada *side population*, “SP”, e verificou-se corresponder nesse estudo a cerca de 0,1% do total das células medulares; correspondia também a cerca de 10% da população positiva para o marcador Sca-1 e negativa ou com baixos níveis de outros marcadores de linhagem (uma das combinações de marcadores usadas para definir HSCs). A Figura 5 ilustra a presença das células SP na população estudada.



Goodell *et al.* (1996) realizaram ensaios funcionais de repopulação competitiva usando transplantes de células SP, células não SP (*non-Side Population*, “NSP”) e células *upper SP* (correspondentes a uma região com células SP em que há alguma sobreposição com NSP) associadas a uma porção não fracionada de células medulares em murganhos irradiados e verificaram que os murganhos que tinham recebido as células SP tinham um enorme aumento de atividade de

Figura 5 População SP da medula óssea. Adaptado de Goodell *et al.* (1996).

células estaminais (avaliado através da proporção de células no sangue periférico descendentes dessa população); esta

atividade era menor nos que tinham recebido a população *upper SP* e muito diminuída nos que tinham recebido a população NSP. As células SP contribuíram também para a formação de células de origem linfóide e mieloide. Goodell e a sua equipa concluíram que a maior parte das células responsáveis pela reconstituição dos elementos do sangue no murganho estariam presentes na fração SP. Assim, pela primeira vez conseguiu-se usar um método relativamente simples de obter uma população celular rica em células com capacidade estaminal (Goodell *et al.*, 1996).

Desde este estudo inicial, várias equipas usaram estratégias semelhantes para estudar populações SP e tentar compreender se estas correspondem a uma população rica em células com propriedades estaminais. A técnica foi usada para estudar neuroesferas (agregados proliferativos em cultura obtidos a partir de células cerebrais ou células embrionárias) de murganho e verificou-se que parte destas correspondiam a células SP, as quais quando em cultura apresentavam fenótipo semelhante a células neurais recentemente isoladas não cultivadas (Hulspas & Quesenberry, 2000). No sangue obtido do cordão umbilical humano foram também isoladas populações SP, as quais foram igualmente fenotipicamente caracterizadas. Desta caracterização com diferentes marcadores, maioritariamente relacionados com a linhagem hematopoiética, resultaram diversas subpopulações, sugerindo que as células SP, pelo menos especificamente neste tecido, são fenotipicamente heterogéneas (Storms, Goodell, Fisher, Mulligan, & Smith, 2000). Nas células SP da medula óssea estão presentes células com marcadores de diferenciação hematopoiética e o estudo da população SP no fígado de murganho revelou que as células desta população apresentavam características fenotípicas heterogéneas, pelo que, tal como os outros métodos de enriquecimento de SSCs, este método aparenta originar populações heterogéneas (Uchida, Leung, & Eaves, 2002; Zhou *et al.*, 2001).

A obtenção de populações SP também foi conseguida a partir de tecido muscular, embora se tenha colocado a hipótese de que estas pudessem não corresponder a células-satélite mas sim a células progenitoras presentes na circulação periférica (Asakura & Rudnicki, 2002; Benchouir *et al.*, 2004). Esta mesma equipa estudou outros tecidos não-hematopoiéticos através do isolamento de populações SP e avaliou o seu potencial hematopoiético, obtendo células SP a partir de músculo, cérebro, fígado, baço, rim, coração, pulmão e intestino delgado de murganhos. Não obtiveram números significativos de células SP quando examinaram sangue periférico, o que sugere que as células SP isoladas nos tecidos hematopoiéticos não têm origem em contaminação dos tecidos pelo sangue. Dentro das células SP os níveis de CD45 também variaram entre tecidos e a capacidade de hematopoiese estava relacionada com a quantidade de células CD45<sup>+</sup>. No entanto, este e outros trabalhos revelam que a população SP isolada a partir do músculo consegue diferenciar-se em células musculares (Asakura & Rudnicki, 2002; Gussoni *et al.*, 1999). No fígado verificou-se que as células ovais apresentam o fenótipo SP e a análise de populações celulares do pulmão e pele também revela a presença destas células (Summer *et al.*, 2003; Tersikh, Vasil'ev, & Vorotelyak, 2008). Verificou-se ainda que numa população pancreática adulta com potenciais progenitores de células  $\beta$  pancreáticas foi detetada uma população SP (Lechner, Leech, Abraham, Nolan, & Habener, 2002). Populações SP foram igualmente isoladas em rim humano, tanto em tecido benigno como em tecido maligno (Addla, Brown, Hart, Ramani, & Clarke, 2008), e na próstata humana, igualmente em tecido normal e com

características malignas (Brown *et al.*, 2007). Outros tecidos tumorais em que se detetaram populações SP incluem o cancro do ovário, cancro da mama e linhas celulares de glioma (Terskikh *et al.*, 2008). Nem todas as populações SP isoladas têm capacidade de regeneração hematopoiética, como foi descrito para as primeiras células SP descritas. Algumas populações, especialmente obtidas a partir de tecidos sólidos, não têm essa capacidade mas apresentam características de multipotência: as células SP obtidas a partir de pele de murganho foram encontradas no tecido muscular; células SP obtidas a partir das glândulas mamárias contribuíram para o desenvolvimento dos ductos e alvéolos (Challen & Little, 2006).

Apesar de ter sido usado inicialmente para HSCs, considera-se atualmente que o fenótipo SP possa ser uma característica comum às várias populações de células estaminais, embora não exclusiva destas, não devendo ser usado por si só como um marcador de células estaminais (Alison, 2003; Terskikh *et al.*, 2008; Wagers & Weissman, 2004). No entanto, é extremamente útil como estratégia de purificação inicial para obtenção de uma população enriquecida em células estaminais/progenitoras sem utilização de marcadores de superfície (Challen & Little, 2006). Uma vez que a utilização do Hoechst33342 requer um citómetro equipado com um laser ultravioleta, que não está disponível em todos os instrumentos devido ao elevado custo, foi estudado um corante excitável pelo laser violeta que origina um padrão semelhante de células SP, o *DyeCyle Violet*. Neste caso também se observa a partir da medula óssea uma população SP semelhante à obtida com o Hoechst, incluindo em termos fenotípicos (Telford, Bradford, Godfrey, Robey, & Bates, 2007).

#### 2.2.1.1. O perfil de fluorescência

---

As células SP apresentam menor fluorescência do Hoechst tanto na emissão azul como na emissão vermelha; isto significaria que estas células não seriam capazes de interiorizar o corante ou que a sua exteriorização estaria aumentada. Uma vez que se sabe que vários corantes são extrudidos para o exterior da célula através de proteínas MDR (de *multidrug resistance*), Goodell *et al.* (1996) propuseram-se a investigar se a adição de um inibidor destas levaria a alterações no perfil de fluorescência. Assim, realizaram a incubação das células com verapamil, o qual inibe as moléculas transportadoras MDR1. Verificaram que a população SP desaparecia quando se adicionava verapamil, concluindo que seria provável que a menor fluorescência das células SP fosse devida a um maior efluxo do corante que pode ser bloqueado com este inibidor. Esta propriedade está ilustrada na Figura 6, onde a população SP desaparece na presença de verapamil (Goodell *et al.*, 2006).

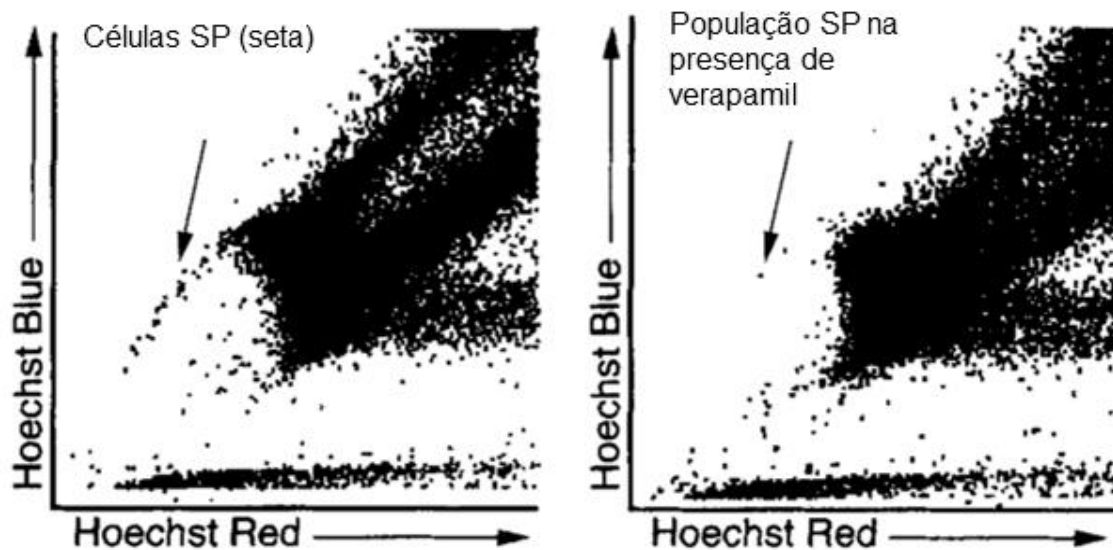


Figura 6 Células da medula óssea incubadas com Hoechst e na ausência (esquerda) ou na presença (direita) de verapamil. Quando incubadas com Hoechst, as células SP formam uma população periférica (esquerda) que desaparece com a adição de verapamil (direita). Adaptado de Goodell *et al.* (1996).

Sugeriram assim que esta propriedade pudesse ser devida a uma maior expressão de MDR na superfície das HSCs, a uma maior atividade da proteína ou a atividade semelhante à das MDR não identificada (Goodell *et al.*, 1996). Estas MDR são codificadas pelos genes MDR1 e pertencem a uma das sete subfamílias integrantes da superfamília de moléculas transportadoras que contêm uma região ABC (de *ATP-binding cassette*, domínio catalítico que faz hidrólise do ATP). As moléculas transportadoras da família ABC estão implicadas no transporte de xenobióticos ou produtos tóxicos para o exterior da célula e têm duas sequências de péptidos conservados implicadas na ligação ao ATP, a Walker A e a Walker B, e uma terceira sequência conservada chamada “assinatura ABC” entre as sequências Walker A e Walker B. A proteína MDR1 é apenas uma de vários tipos de proteínas transportadoras potencialmente implicadas no transporte do Hoechst para o exterior das células (Alison, 2003). Outras duas conhecidas moléculas transportadoras da mesma superfamília são a MRP1 e a Bcrp1. Consoante os autores a terminologia para as moléculas varia de acordo com a espécie e pode ser importante na compreensão de estudos comparativos, estando os duos humano/murganho representados na Tabela 3.

Tabela 3 Nomenclatura de algumas das proteínas ABC humanas e do murganho com a correspondente classificação ABC.

| Proteína transportadora humana | Proteína correspondente no murganho | Outros nomes comuns/significado da abreviatura             | Classificação ABC |
|--------------------------------|-------------------------------------|--|-------------------|
| <b>MDR1</b>                    | Mdr1a/1b                            | P-glicoproteína, gp170 (de <i>glycoprotein170</i> ), CD243 | ABCB1             |
| <b>MRP1</b>                    | MRP1                                | <i>Multidrug resistance-associated protein 1</i>           | ABCC1             |
| <b>ABCG2</b>                   | Bcrp1                               | <i>Breast cancer resistance protein 1</i>                  | ABCG2             |

Os estudos apontam para o facto da capacidade de extrusão do Hoechst nas HSCs de murganhos e humanos ser maioritariamente devida à expressão do transportador ABCG2 (Alison, 2003; Scharenberg, 2002; Zhou *et al.*, 2001). Os transportadores MDR1 parecem ter menor afinidade para o Hoechst do que os transportadores ABCG2, sendo que a utilização de verapamil pode não eliminar por completo a população SP (Zhou *et al.*, 2002). A utilização de reserpina, um inibidor de vários transportadores ABC, elimina a população SP, bem como a depleção de ATP, demonstrando que se trata de um processo de transporte ativo (Zhou *et al.*, 2001). A expressão das proteínas ABCG2 em células A549 (linha de células de carcinoma pulmonar humano) foi suficiente para obter o fenótipo SP, enquanto que usando uma concentração de verapamil suficiente para inibir as bombas MDR1 só houve uma inibição moderada do efluxo de Hoechst (Scharenberg, 2002). De maneira semelhante, a expressão de ABCG2 através de um vetor retroviral em células da medula óssea de murganho aumentou a fração SP para mais de 60% do total de células estudadas (Zhou *et al.*, 2001). A expressão de ABCG2 também foi detetada em populações SP de músculo esquelético de murganho e de medula óssea do macaco Rhesus, enquanto que as populações controlo (NSP) não expressavam a proteína (Bunting, 2002). Por outro lado, murganhos *knockout* para os genes Mdr1a/1b revelaram possuir números normais de células SP na medula óssea e no fígado, sem alteração das funções hematopoiéticas, enquanto que murganhos *knockout* para o gene Bcrp1 possuíam números significativamente inferiores de células SP (Uchida *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2002). Apesar de a população SP dos murganhos *knockout* para o gene Bcrp1 também não possuir marcadores de HSCs nem capacidade repopulacional, estes murganhos não apresentavam alterações no funcionamento do sistema de células estaminais hematopoiéticas, não tendo alterações celulares na medula óssea ou rácios anormais de células mieloides. Assim, a expressão das proteínas Bcrp1 parece ser importante para o fenótipo SP, mas não essencial para a

manutenção de HSCs, as quais se mantêm normais mas aparecem na região NSP, o que indica que não existe uma correlação direta entre células estaminais e células SP (Challen & Little, 2006; Zhou *et al.*, 2002).

Em células SP encontradas em neoplasias a expressão de moléculas ABC está relacionada com a resistência a vários fármacos usados em quimioterapia (Hirschmann-Jax *et al.*, 2004), mas a função exata destas proteínas em células potencialmente estaminais não é completamente clara. A expressão forçada de ABCG2 da medula óssea de ratinho inibiu a diferenciação celular, sugerindo que esta proteína pode estar implicada nos mecanismos de autorrenovação mais primitivos das células estaminais e ser suprimida quando estas se diferenciam, enquanto que a expressão forçada de MDR1 levou à expansão de HSCs em ratinho resultando numa doença mieloproliferativa (Terskikh *et al.*, 2008; Ueda *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2002). Por outro lado também é possível que a expressão de ABCG2 esteja relacionada com a eliminação de xenobióticos e compostos endógenos genotóxicos ou causadores de *stress* hipóxico, fatores importante em células com uma longevidade elevada no organismo e que mantêm capacidades replicativas elevadas quando ativadas. Vários estudos demonstraram uma sensibilidade maior em animais *knockout* para Mdr1a/1b e/ou Bcrp1 a diversas substâncias e maior resistência a vários fármacos citotóxicos com expressão forçada destas mesmas proteínas (Challen & Little, 2006; Jonker *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2002).

### **2.3. Caracterização funcional**

---

A caracterização de populações celulares através de ensaios funcionais é essencial para averiguar as suas propriedades de autorrenovação e diferenciação. Nas HSCs é possível avaliar a capacidade de uma única célula estaminal hematopoiética reconstituir a longo prazo todas as linhagens da população sanguínea em modelos animais irradiados, mas em outros tecidos estas condições não são obtidas (Bianco *et al.*, 2008; Goodell *et al.*, 1996). A avaliação *in vivo* das propriedades estaminais das HSCs pode ser estudada eliminando a população residente de um hospedeiro e avaliando o potencial hematopoiético de populações-teste, determinando qual a sua contribuição para a formação de células sanguíneas (ensaios de repopulação competitiva) (Goodell *et al.*, 1996; Szilvassy, 2004). Ensaios de transplantação também podem ser usados de maneira eficaz no estudo de células estaminais da linha germinativa masculina (Kanatsu-Shinohara & Shinohara, 2013).

Outra propriedade funcional das células estaminais é a sua capacidade de originar colónias. As colónias formam-se a densidades elevadas, não sendo, no entanto, possível confirmar que têm origem clonal, isto é, a partir de uma única célula. Para que estes ensaios tenham



utilidade científica, realizam-se usando densidades celulares baixas (denominadas densidades clonais) de maneira a poder confirmar que as colónias têm origem clonal. Por outro lado, a capacidade de formar colónias é independente da densidade, pelo que devem surgir a várias densidades clonais. Esta capacidade formadora de colónias (CFU, *colony forming unit*), é conhecida para as MSCs obtidas da medula óssea (Bianco *et al.*, 2008), sendo também descrita noutros tecidos, como no endométrio (Chan, Schwab, & Gargett, 2004). No entanto, outras células, como células progenitoras e fibroblastos, possuem igualmente capacidade de formar colónias (Phinney, 2007). Para além desta propriedade, em cultura também se pode avaliar o potencial proliferativo de populações potencialmente estaminais através da avaliação de diferentes parâmetros, como o tempo de duplicação da população (PDT, *Population Doubling Time*), o número de células duplicadas e tempo de geração (GT, *Generation Time*) (Burk *et al.*, 2013; Vidal *et al.*, 2007).

Outras estratégias têm sido usadas numa tentativa de detetar nos tecidos a presença de SSCs, já que são células quiescentes sem marcadores específicos. Uma dessas técnicas é a deteção de *label-retaining cells* (LRC). Para esta técnica, análogos dos nucleótidos, como a 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU), são fornecidos às células e integrados no DNA genómico durante a replicação celular, sendo marcados para observação. Com novos ciclos de divisão celular as células vão perdendo a marcação nuclear por diluição. Ao fim de cerca de quatro divisões celulares, o sinal desaparece. Assim, as células que mantêm marcação sofreram poucas divisões celular e são possíveis progenitoras, daí serem denominadas *label-retaining cells* (Alcaraz, Gil-Sanchis, Perucho, & Valles, 2009; Fuchs, Tumber, & Guasch, 2004; Gargett & Masuda, 2010). Estas células foram detetadas no endométrio de murganho por duas equipas diferentes (Cervelló, Martínez-Conejero, Horcajadas, Pellicer, & Simón, 2007; Chan & Gargett, 2006). Usando uma técnica com o mesmo fundamento foi também possível identificar células de propriedades estaminais em culturas de adenocarcinoma pancreático (denominadas *Cancer Stem Cells*, CSCs, de células estaminais cancerígenas) usando citometria de fluxo (Dembinski & Krauss, 2009).

Existem ainda outras colorações fluorescentes semelhantes ao Hoechst33342, como o já referido *DyeCyle Violet*, que também identifica células SP, e a rodamina, a qual é eliminada para o exterior de células potencialmente estaminais pelas MDR1 (Martin *et al.*, 2004).

Os ensaios de diferenciação são frequentemente utilizados para estudar a multipotencialidade das células estaminais. No caso das HSCs, uma vez que são sensíveis à radiação, podem ser realizados ensaios *in vivo*, como referido anteriormente. No caso de outras SSCs, como as MSCs e as NSCs, são usados meios de diferenciação na cultura de uma população-teste, procurando-se evidências histológicas e a nível de expressão de genes e marcadores de diferenciação celular. Para confirmar a capacidade de

multidiferenciação das MSCs usam-se meios de diferenciação osteogénica, adipogénica e condrogénica. As suas características, bem como as técnicas para averiguar sinais de diferenciação, estão esquematizadas na Figura 7.



Figura 7 Indução de osteogénese, adipogénese e condrogénese. Adaptado de Cervelló *et al.*, 2010; Spaas *et al.*, 2013; Vater *et al.*, 2011.

No caso da osteogénese, o Runx-2 (*runt-related transcription factor-2*, também conhecido como Cbfa-1, *core binding factor alpha 1*) é um factor de transcrição precoce de diferenciação osteogénica, tal como o colagénio tipo I alfa-1 (Col1a1), o *transforming growth factor-beta 1* (TGF- $\beta$ 1), a osteonectina e a *bone morphogenetic protein 2* (BMP-2). A osteocalcina e a osteopontina são expressas mais tardiamente (De Schauwer *et al.*, 2011; Tuan *et al.*, 2003; Vater *et al.*, 2011). As MSCs com capacidade de diferenciação osteogénica alteram a sua forma inicialmente fusiforme para uma forma cuboide e produzem matriz extracelular, formando mais tarde agregados ou nódulos. Estes agregados podem ser

corados com vermelho de alizarina ou von Kossa. A matriz contém principalmente colagénio tipo I e existe uma acumulação de cálcio, o qual pode ser quantificado através de ensaios colorimétricos. A expressão de fosfatase alcalina também aumenta e pode ser quantificada por ensaios colorimétricos (Vater *et al.*, 2011). O meio indutor de diferenciação contém dexametasona,  $\beta$ -glicerofosfato, ácido ascórbico e por vezes combinações de vitamina D3, TGF- $\beta$  e BMP, levando à produção de matriz extracelular com mineralização desta, produção de colagénio e expressão de marcadores osteogénicos.

Na diferenciação adipogénica, pré-adipócitos dividem-se até atingirem a confluência e, ao se diferenciarem em adipócitos, adotam uma forma esférica e expressam várias proteínas de matriz extracelular, como a fibronectina, laminina e colagénios tipo I, III, IV, V e VI. Posteriormente surgem vacúolos no interior das células que contêm gotículas lipídicas e podem ser coradas com *oil red O*. A atividade da glicerol-2-fosfato desidrogenase (GPDH) pode ser determinada. Um dos fatores de transcrição responsável pela indução da adipogénese é o *peroxisome proliferation-activated receptor  $\gamma$ 2* (PPAR $\gamma$ 2). A expressão de lipoproteína lipase (LPL) e da cadeia alfa 2 do colagénio tipo VI (Col6a2) ocorrem numa fase precoce, enquanto que a leptina, a adiponectina e a *fatty acid-binding protein-4* (FABP4/aP2) são expressas mais tardiamente. Para induzir diferenciação adipogénica o meio contém dexametasona, 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX), insulina e indometacina, bem como por vezes triiodotironina (T3), ácido ascórbico-2-fosfato e *basic fibroblast growth factor* (bFGF), estimulando a transcrição de genes adipogénicos, a acumulação de lípidos e a inibição da diferenciação osteoblástica e osteoclástica (Vater *et al.*, 2011).

Para se obter a diferenciação condrogénica é necessário o contacto célula-a-célula. As células adotam uma forma arredondada e grande, produzindo matriz extracelular abundante formada por uma rede organizada de colagénio, proteoglicanos agregantes e glicosaminoglicanos. Colorações como o azul de Alcian, o azul de toluidina e a safranina O permitem a sua identificação. O Sox9 é um factor de transcrição expresso precocemente e leva à expressão dos genes do colagénio tipo II, tipo IX, tipo X, tipo XI, agrecano e *cartilage link protein*. O colagénio X é usado para identificação de condrócitos hipertróficos diferenciados. Para a diferenciação utilizam-se fatores condrogénicos, associados a um grau elevado de contacto célula-a-célula. Estes fatores incluem dexametasona, ácido ascórbico, TGF- $\beta$ , BMP, *fibroblast growth factor* (FGF) e *insulin-like growth factor* (IGF), sendo os três primeiros os mais eficazes (Vater *et al.*, 2011).

## 2.4. MSCs de equino

---

Apesar de várias designações terem sido atribuídas às células estaminais mesenquimais ao longo do tempo e das alterações de nomenclatura sugeridas pela ISCT (referidas no capítulo 2.2), o termo mais comum na literatura continua a ser *mesenchymal stem cells* (células estaminais mesenquimais, abreviado como MSCs). Como descrito por Sethe, Scutt, & Stolzing (2006), este termo foi tornado comum por Caplan em 2001, ao fazer referência ao trabalho de Friedenstein e Owen. As MSCs foram inicialmente obtidas a partir da medula óssea em 1963 por Friedenstein e Petrakova, como revisto por Phinney (2002), e são capazes de originar células do tecido conjuntivo, adipócitos, condrócitos, osteoblastos e células do estroma da medula óssea. Atualmente sabe-se que as MSCs também podem ser encontradas na gordura, pele e músculo e existem autores que defendem que os pericitos são MSCs (Caplan & Bruder, 2001). Outros tecidos humanos em que se identificaram MSCs incluem o sangue do cordão umbilical, placenta, fígado, baço, testículos, sangue menstrual, líquido amniótico, pâncreas e periósteo (Vater *et al.*, 2011). Nos equinos, as quatro fontes mais frequentes de obtenção de MSCs são a medula óssea, o tecido adiposo, o cordão umbilical (tanto sangue como matriz) e o sangue periférico (Penny *et al.*, 2012). Também foi possível obter potenciais MSCs de periósteo e músculo (caracterizadas pela sua capacidade de aderência ao plástico, diferenciação e marcadores de superfície) (Radtke, Nino-Fong, Gonzalez, Stryhn, & McDuffee, 2013). A partir do tendão equino obteve-se uma população com capacidade de diferenciação nas três linhagens típicas para MSCs, existindo, no entanto, muitos poucos trabalhos nesta área (ainda que a aplicação de MSCs na terapia de lesões tendinosas seja uma das potencialidades destas células) (Burk *et al.*, 2013). Também recentemente se obtiveram MSCs a partir do líquido amniótico (Lovati *et al.*, 2011), gengiva e ligamentos periodontais (Mensing *et al.*, 2011).

As MSCs possuem capacidade de diferenciação osteogénica, adipogénica e condrogénica a partir de uma célula individual (Deans & Moseley, 2000; Pittenger *et al.*, 1999). Nos equinos, a diferenciação nas linhagens osteogénica e condrogénica foi já reportada por diferentes equipas em MSCs equinas derivadas da medula óssea, do tecido adiposo, do cordão umbilical, do sangue extraído do cordão umbilical ou do sangue periférico (De Schauwer *et al.*, 2011). Os protocolos de diferenciação adipogénica foram otimizados passando-se a incluir soro de coelho. Para além destas principais linhas de diferenciação, várias equipas obtiveram diferenciação de MSCs equinas em células das linhas neuronal, miogénica, tenogénica e hepatogénica (De Schauwer *et al.*, 2011). Alguns estudos indicam que o potencial osteogénico pode ser maior nas MSCs da medula óssea, enquanto que o condrogénico pode ser melhor nessas e nas MSCs obtidas do cordão umbilical (Barberini *et al.*, 2014; Burk *et al.*, 2013; Maia *et al.*, 2013). O potencial condrogénico das MSCs da medula óssea também parece ser maior em condições de hipóxia (5% de oxigénio) do que

em condições de normóxia (20% de oxigênio) (Ranera *et al.*, 2013). As características das MSCs de equinos mais frequentemente utilizadas estão ilustradas na Figura 8.

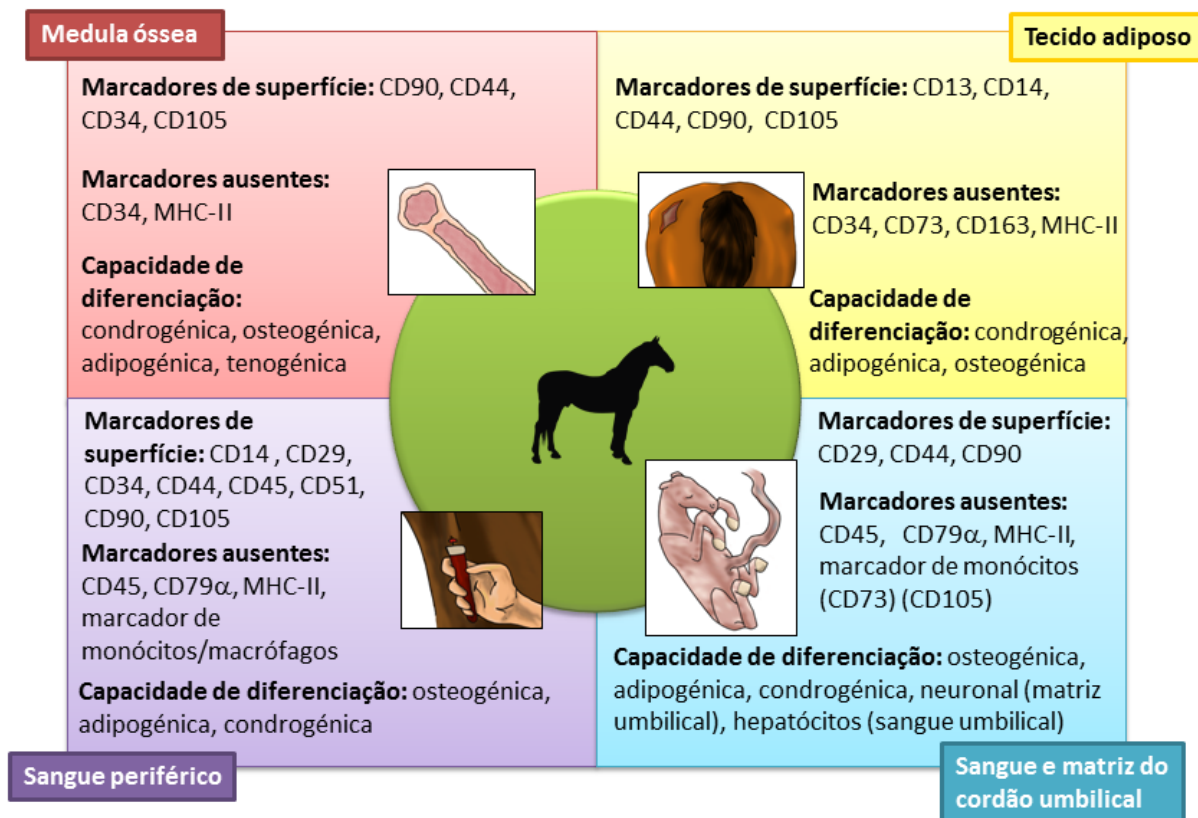


Figura 8 Algumas características de MSCs de equino adaptadas de diferentes trabalhos (referidos no corpo do texto).

As MSCs obtidas a partir da medula óssea têm capacidade de aderência ao plástico e capacidade de diferenciação osteogénica, condrogénica e adipogénica verificadas em diversos estudos (Barberini *et al.*, 2014; Maia *et al.*, 2013). Maia e colaboradores (2013) reportaram as MSCs como positivas para CD90 e CD44 e negativas para CD34. Para além do CD90, CD44 e CD34, Barberini e a sua equipa (2014) referiram também a positividade para CD105 e a negatividade para MHC-II, embora outros estudos revelem níveis muito variáveis ou negativos de CD105 (colocando-se a hipótese de não haver reatividade cruzada anticorpo-antígeno). No mesmo estudo de Barberini *et al.* (2014) as células do tecido adiposo diferenciaram-se em tecido ósseo, adiposo e condrogénico, como noutros trabalhos (Braun *et al.*, 2010; Burk *et al.*, 2013; Shell *et al.*, 2013). Relativamente aos marcadores de superfície, MSCs do tecido adiposo demonstraram ser positivas para CD90 e CD105 (Barberini *et al.*, 2014; Braun *et al.*, 2010), CD44 (Barberini *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2009), CD13 (Carvalho *et al.*, 2009) e CD14 (Braun *et al.*, 2010) e negativos para MHC-II (Barberini *et al.*, 2014), CD34 (Barberini *et al.*, 2014; Braun *et al.*, 2010) e CD73 e CD164 (Braun *et al.*, 2010).

Uma outra equipa estudou vários marcadores de superfície em MSCs do cordão umbilical à quarta passagem (incluindo em células criopreservadas) e à décima passagem (De Schauwer *et al.*, 2012). Concluíram que as MSCs eram positivas para CD29, CD44 e CD90, não expressando MHC-II, CD45, CD79 $\alpha$  e marcador de monócitos, e tinham expressão baixa e variável de CD105, tal como CD73. Estes resultados foram corroborados por um estudo efetuado após expansão de células criopreservadas do cordão umbilical, que foram positivas para CD29, CD44 e CD90, negativas para CD45, CD73, CD79 $\alpha$ , MHC-II e marcador de monócitos. Neste estudo não se detetou CD105 na população celular e o nível de CD45 foi o único significativamente diferente para amostras criopreservadas e frescas, ainda que tenha sido negativo em ambas as populações (De Schauwer *et al.*, 2013).

As células obtidas a partir do sangue periférico foram inicialmente isoladas com base na sua morfologia e capacidade de diferenciação osteogénica e adipogénica, embora não se tenham conseguido nesse estudo resultados definitivos para a diferenciação condrogénica (Koerner *et al.*, 2006). Atualmente as MSCs obtidas do sangue periférico demonstraram já ter capacidade de adesão ao plástico e capacidade de diferenciação osteogénica, adipogénica e condrogénica suportadas por estudos diferentes (Dhar *et al.*, 2012; Spaas *et al.*, 2013). Dhar e colaboradores (2012) reportaram as células como positivas para CD34, CD45, CD51, CD90 e CD105, embora estas tenham sido obtidas a partir de células mononucleares sanguíneas (população em que também existem precursores hematopoiéticos). O trabalho de Braun *et al.* (2010) revelou que as MSCs a partir do sangue periférico também eram positivas para CD34 e CD14. Noutro estudo, as células foram obtidas do sangue periférico usando um protocolo com separação de células mononucleadas dos outros elementos do sangue, foram positivas para CD29, CD44, CD90 e CD105 e negativas para CD45, CD79 $\alpha$  e marcador de monócitos/macrófagos (Spaas *et al.*, 2013). Este trabalho também concluiu que as células apresentavam capacidade de crescimento com autorrenovação.

## **2.5. SSCs no útero**

---

O útero é um órgão com uma enorme capacidade regenerativa, suspeitando-se desde há muito da presença de algum tipo de células estaminais responsáveis por esta capacidade (Alcaraz *et al.*, 2009). A parede do útero é formada por três camadas: o endométrio, constituído pela mucosa e submucosa; o miométrio, a camada muscular; e o perimétrio ou serosa. Na mulher e no murganho, o endométrio tem ainda duas regiões com estrutura e funções diferentes. A camada superficial é denominada camada funcional, enquanto que a camada mais profunda é denominada a camada basal (Priedkalns & Leiser, 2006). Ao longo dos ciclos menstruais e éstricos há um desenvolvimento da camada funcional, que degenera

no final do estro ou é eliminada para o exterior através da menstruação. A camada basal não sofre estas alterações e não é reabsorvida ou eliminada através da menstruação, restaurando a camada funcional no ciclo seguinte. Por esse mesmo motivo, suspeita-se que a eventual presença de SSCs no útero ocorra na camada basal do endométrio (Alcaraz *et al.*, 2009; Cervelló & Simón, 2009; Gargett & Masuda, 2010; Friedkalns & Leiser, 2006). As células do epitélio do endométrio são responsivas aos sinais hormonais produzidos ao longo do ciclo, alterando a sua estrutura e tamanho. A região subepitelial da camada funcional é muito vascularizada, possui tecido conjuntivo e células imunitárias (maioritariamente macrófagos e mastócitos), tornando-se menos celular com o aumento da profundidade. Na égua esta camada subepitelial é denominada estrato compacto, enquanto que o estroma mais profundo é denominado estrato esponjoso e as duas em conjunto formam a lâmina própria do endométrio (Kenney, 1978; Schlafer, 2007; Snider, Sepoy, & Holyoak, 2011). Existem também glândulas tubulares nas espécies domésticas e primatas que apresentam alterações durante os ciclos éstricos ou menstruais. O aumento dos níveis de estrogénio estimula o crescimento e a ramificação das glândulas e geralmente a estimulação por progesterona leva ao enovelamento das glândulas e ao aumento da sua secreção. No caso da égua, esta ramificação e enovelamento das glândulas são extensos comparativamente com os carnívoros e a tortuosidade das glândulas está relacionada com a dominância da progesterona (Kenney & Doig, 1986; Friedkalns & Leiser, 2006). No endométrio humano o marcador CD9 é fortemente expresso na superfície celular do epitélio glandular e está associado à E-caderina (marcador epitelial), enquanto que o marcador CD13 está associado ao estroma endometrial e à expressão de vimentina, podendo o CD9 ser usado como marcador glandular e o CD13 como marcador do estroma (Kato *et al.*, 2007).

#### 2.5.1. Populações com características de SSCs no útero

---

Vários estudos apontam para a existência de SSCs no endométrio humano, baseando-se na atividade clonogénica das células endometriais e expressão de marcadores de células estaminais (Cervelló & Simón, 2009). Tanto no epitélio como no estroma existem células com capacidade formadora de colónias. Nestes estudos observaram-se dois tipos de colónias, colónias de grandes dimensões, eventualmente correspondentes a SSCs, e colónias de pequenas dimensões, que poderiam corresponder a células TA (Chan *et al.*, 2004). A atividade estaminal estaria relacionada com as colónias de grandes dimensões, tendo por base a sua eficiência clonogénica, potencial de proliferação e capacidade de diferenciação em várias linhas. Estas células com capacidade clonogénica elevada foram encontradas em todas as fases do ciclo menstrual e também em úteros inativos e atroficos (Alcaraz *et al.*, 2009). No murganho várias equipas detetaram LRC no endométrio através de marcação com BrdU e as LRC localizadas na camada profunda do estroma expressavam

simultaneamente c-kit e Oct-4 (Alcaraz *et al.*, 2009). Estas LRC encontram-se também junto a vasos sanguíneos perto da junção entre o endométrio e o miométrio, local onde no murganho e na mulher se dá remodelação do tecido uterino (Gargett & Masuda, 2010).

A presença de SSCs no útero é suportada por ensaios funcionais *in vivo* em que foi possível reconstituir estruturas com histologia uterina através de transplantes em murganhos. Um dos estudos usou frações endometriais totais e conseguiu obter esta reconstrução em diferentes murganhos a partir de uma amostra de endométrio (Masuda *et al.*, 2007). Usando células SP e a mesma abordagem, foi possível verificar que as células com este fenótipo têm capacidade de reconstruir tecido com características histológicas de endométrio *in vivo* (Cervelló *et al.*, 2011; Masuda *et al.*, 2010).

Outra questão que se colocou foi a potencial origem destas SSCs. Uma equipa de investigadores sugeriu que no estroma uterino existiria uma população de células com propriedades estaminais de origem mesenquimal (ou seja, MSCs). Isolaram células uterinas da mulher pela sua capacidade de aderência ao plástico e demonstraram por citometria de fluxo que estas eram negativas para marcadores hematopoiéticos como CD34, CD14 e CD45, e positivas para CD29, CD73 e CD90. Para além disto, confirmaram a sua diferenciação na linhagem adipogénica (Alcaraz *et al.*, 2009; Dimitrov *et al.*, 2008). Em outros estudos com células humanas conseguiu-se fazer diferenciação em músculo liso, cartilagem, tecido adiposo e tecido ósseo a partir de colónias de células endometriais, bem como neurónios dopaminérgicos a partir de células do estroma. As colónias obtidas a partir de culturas endometriais frescas apresentavam marcadores associados com MSCs: positivas para CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 mas negativas para Stro-1, CD31, CD34, CD45 ou HLA-DR (Gargett & Masuda, 2010). Uma estratégia de isolamento de MSCs endometriais humanas baseou-se na co-expressão do marcador CD146 (perivascular e endotelial) e do marcador PDGF-R $\beta$  (*platelet-derived growth factor-receptor beta*), verificando que a população positiva para os dois marcadores tinha capacidade formadora de colónias significativamente superior à fração negativa, foi capaz de diferenciação na linhagem osteogénica, condrogénica, adipogénica e miogénica e possuía marcadores de MSCs. Estas células estavam localizadas na região perivascular de alguns vasos sanguíneos da camada funcional e da camada basal (Schwab & Gargett, 2007). O isolamento de células endometriais com apenas com dois marcadores revela ser um método simples com a vantagem de permitir caracterizar células que não precisam de passar por um passo de cultura celular, no qual as características das células podem ser alteradas (Gargett & Masuda, 2010; Schwab & Gargett, 2007). Mais recentemente, a utilização de um único marcador foi eficaz na obtenção de uma população endometrial com multipotencialidade, autorrenovação e capacidade de gerar estroma endometrial *in vivo*. Este marcador, W5C5, encontra-se numa localização exclusivamente perivascular tanto na



camada funcional como basal do endométrio humano. A maior parte das células positivas para W5C5 são positivas para o PDGF-R $\beta$ , enquanto que todas são positivas para CD146. Quando células W5C5<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> são comparadas com células PDGF-R $\beta$ <sup>+</sup>CD146<sup>+</sup>, verifica-se que as primeiras têm capacidade formadora de colónias significativamente maior (Masuda, Anwar, Bühring, Rao, & Gargett, 2012). Um estudo recente baseou-se em técnicas de retenção de corantes mas utilizou nanopartículas fluorescentes para identificar células quiescentes no estroma do endométrio humano, eliminando a necessidade de fixação das células. Verificaram que estas possuíam maior capacidade formadora de colónias e de autorrenovação que as células não marcadas, capacidade de diferenciação e marcadores associados a MSCs, incluindo W5C5 e a associação PDGF-R $\beta$ /CD146 (Xiang, Chan, Ng, & Yeung, 2014).

No endométrio humano foi possível identificar uma população SP a partir do estroma e do epitélio e esta última, em condições *in vitro*, originou uma estrutura semelhante a uma glândula após cinco meses de expressão do marcador CD9. No entanto, neste estudo não foi referida diferenciação noutras linhagens (Kato *et al.*, 2007). Num outro estudo as células SP isoladas expressavam marcadores de indiferenciação como o c-kit e o Oct4, apresentando atividade da telomerase intermédia entre as células estaminais embrionárias humanas e linhas diferenciadas; a maioria desta população era também positiva para CD90 e negativa para CD34 e CD45, sugerindo origem mesenquimal. Nas SP do estroma também havia expressão de CD90 e ainda de CD13, vimentina e dos marcadores c-Kit e Oct-4, mas não de E-caderina e CD9 (marcadores epiteliais) (Cervelló & Simón, 2009). A população SP não tem variações significativas consoante a idade da dadora, sugerindo que se mantém constante durante a vida reprodutiva. Por outro lado, o potencial de formação de colónias das células SP é superior ao das células NSP tanto no epitélio como no estroma (Alcaraz *et al.*, 2009). As células SP em cultura recente não expressam CD9 ou CD13, mas a sua cultura em colagénio ou Matrigel<sup>TM</sup> (revestimento de gelatina e proteínas) faz com que expressem esses marcadores (Kato *et al.*, 2007). As células SP têm capacidade de reconstituir tecido endometrial *in vivo* em murganhos imunocomprometidos (Masuda *et al.*, 2010; Cervelló *et al.*, 2011). Foi criada uma linha celular SP e outra NSP a partir de endométrio da mulher (tanto do epitélio como do estroma). A população SP foi caracterizada fenotipicamente e verificou-se ter capacidade de diferenciação adipogénica e osteogénica (Cervelló *et al.*, 2011). A análise de tecido endometrial revelou que as células positivas para o marcador ABCG2 se encontravam a revestir os vasos sanguíneos, tanto na camada basal como na camada funcional e tinham co-localização com o marcador CD31, usado para células endoteliais. Por outro lado, estas células estavam localizadas junto das células endometriais com co-expressão de PDGF-R $\beta$  e CD146 (Gargett & Masuda, 2010). Tal como

existe uma população SP no endométrio humano, esta também é encontrada em linhas de células tumorais uterinas e em amostras de tecido neoplásico (Kato *et al.*, 2007).

Em suma, existem várias subpopulações que podem ser candidatas a SSCs endometriais: as células endometriais clonogénicas, as células SP endometriais, as células positivas para os marcadores CD29, CD33 e CD90, as células positivas para CD146 e PDGF-R $\beta$  e as células positivas para W5C5.

A proveniência das SSCs no endométrio é controversa, embora existam dados a suportar a teoria de que pelo menos parte delas pode ter origem em células da medula óssea em circulação, as quais poderão incorporar-se noutros tecidos adultos, contribuindo para a sua regeneração ou angiogénese (Gargett & Masuda, 2010). Uma equipa trabalhou com mulheres que receberam transplantes medulares, detetando células dadoras integradas tanto no epitélio como no estroma endometrial (Taylor, 2004). Num outro estudo, as mulheres receberam células medulares de indivíduos do sexo masculino e encontraram-se células nas glândulas endometriais com expressão do cromossoma Y que expressavam o receptor alfa de estrogénio (Er $\alpha$ ) (Ikoma *et al.*, 2009). Usando um modelo semelhante, verificou-se que as células masculinas dadoras foram encontradas no útero mas não contribuíram para a população SP uterina das mulheres receptoras (Cervelló *et al.*, 2012).

### **3. Células estaminais adultas: papel em processos patológicos**

---

Apesar de inúmeros aspetos da biologia das células estaminais adultas serem ainda desconhecidos, a sua implicação em vários processos patológicos tem sido investigada, nomeadamente na área da oncogénese. Surgiu assim o conceito de “células estaminais cancerígenas” (CSCs, de *Cancer Stem Cells*). Esta hipótese baseia-se na existência de uma fração celular tumoral que tem capacidade de autorrenovação e que, assim, mantém a progressão do processo tumorigénico (Das *et al.*, 2008). Existem estudos que sugerem a presença de CSCs em casos de leucemia, cancro da mama e tumores cerebrais, bem como no cancro do cólon, pâncreas, fígado, pulmão e ovário, da próstata, e no melanoma (Kato *et al.*, 2007; Wang, Wu, Wang, & Huang, 2013). Estas células apresentam marcadores de superfície existentes em células estaminais dos tecidos normais. A população de um tumor é heterogénea no seu potencial proliferativo e capacidade de diferenciação, originando o conceito de que uma neoplasia pode ser comparada a um órgão na medida em que existe uma hierarquia celular, existindo, neste caso, uma população reduzida de CSCs. Estas CSCs têm propriedades de células estaminais, mas não são controladas pelo nicho celular, originando desregulação da sua capacidade proliferativa, e são capazes de iniciar processos tumorigénicos quando transplantadas para hospedeiros sem neoplasias (Gargett & Masuda,

2010; Wang *et al.*, 2013). Foram também associadas à resistência aos agentes quimioterápicos e a sua sobrevivência origina recidivas, pelo que algumas abordagens terapêuticas se têm focado nesta população (Wang *et al.*, 2013).

Os próprios processos biológicos de reparação tecidual podem beneficiar do estudo destas células, sendo estudadas inclusive numa perspetiva terapêutica. Os processos de reparação tecidual têm associados uma fase regenerativa com substituição das células lesionadas por células semelhantes – que seria resultante das células estaminais e sua descendência – e uma fase de fibrose em que o parênquima do tecido é substituído por tecido fibroso, formando uma cicatriz. No entanto, esta fibrose pode ser desregulada e continuar, originando uma doença fibroproliferativa. A célula implicada neste processo é o miofibroblasto e seus percursores, que são principalmente células mesenquimais locais como perícitos e fibroblastos perivascularres ou residentes. A produção de mediadores por linfócitos ativados estimula a transformação das células mesenquimais em miofibroblastos, passando a expressar  *$\alpha$ -smooth muscle actin* ( $\alpha$ -SMA) e a produzir matriz extracelular constituída por colagénio tipo I, tipo III, tipo IV, glicosaminoclicanos, proteoglicanos e glicoproteínas como laminina e fibronectina. Em suma, crê-se que as células responsáveis pelo processo de fibrose são células residentes de origem mesenquimal (Hutchison, Fligny, & Duffield, 2013). No entanto, existem indícios de que células derivadas da medula óssea possam também contribuir para processos de fibrose, sendo encontrados descendentes com características de miofibroblastos em locais onde se desenvolve esse processo no hospedeiro. Nesta linha de investigação, sabe-se também que as MSCs podem adotar este fenótipo, apesar de possuírem também propriedades anti-inflamatórias, obscurecendo o seu papel no processo (Mackinnon & Forbes, 2013). Foi igualmente proposto que os perícitos podem ser uma fonte de MSCs ou, pelo menos, uma subpopulação de MSCs, que ao saírem do seu local perivascular adotam características imunomoduladoras como as MSCs, suportando a angiogénese, regeneração tecidual e levando a imunossupressão local para evitar reações autoimunes. Outros estudos suportam também a ideia de que as MSCs têm origem perivascular, sendo importantes para a integridade dos vasos sanguíneos. Todas estas hipóteses indicam que uma relação entre MSCs e o processo de fibrose é possível (Lepperdinger, 2011; Ohishi & Schipani, 2010; Penny *et al.*, 2012; Strioga, Viswanathan, Darinskas, Slaby, & Michalek, 2012). A sua localização perivascular pode também desempenhar algum papel no desenvolvimento de calcificação ectópica nos vasos e válvulas cardíacas, tendo-se verificado que MSCs envelhecidas com localização compatível com perícitos adotam fenótipos osteogénicos quando sujeitas a estímulo inflamatório. A ossificação ectópica seria outro processo patológico em que, neste âmbito, as MSCs podem estar implicadas. Por outro lado, o aumento do tecido adiposo e perda do suporte ósseo que

surtem no osso e medula óssea com a idade podem ser devidos a alterações do potencial de diferenciação das MSCs relacionadas com o seu envelhecimento (Lepperdinger, 2011).

### 3.1. Processos patológicos no útero

---

Na mulher existem várias doenças relacionadas com a fertilidade em que se suspeita da implicação de SSCs presentes no útero. Estas doenças incluem o cancro endometrial, a hiperplasia endometrial, a endometriose e a adenomiose (Alcaraz *et al.*, 2009).

O envolvimento de SSCs no cancro endometrial estaria relacionado com a teoria das CSCs, em que estas mantêm a evolução do processo neoplásico. Estas CSCs podem evoluir ao longo da doença, adquirindo novas características e, na sua génese, podem partir das SSCs residentes que, por obtenção de mutações em genes supressores de oncogénese ou acumulação de alterações genéticas ou epigenéticas, se tornam disfuncionais e ganham vantagem seletiva sobre as outras células, sobrevivendo e originando clones (Alcaraz *et al.*, 2009; Gargett & Masuda, 2010). No cancro endometrial foi identificada uma população SP com potencial proliferativo a longo prazo, autorrenovação, migração e capacidade tumorigénica *in vivo* (Kato *et al.*, 2010). A hiperplasia endometrial é considerada uma situação precursora do cancro endometrial (Alcaraz *et al.*, 2009).

A endometriose é uma situação que ocorre na mulher distinta da endometrose da égua. Na endometriose há desenvolvimento de tecido endometrial fora do útero, originando dor pélvica, infertilidade e inflamação. O mecanismo fisiopatológico subjacente a esta doença é desconhecido, mas a teoria da menstruação retrógrada é a mais aceite (Alcaraz *et al.*, 2009; Gargett & Masuda, 2010; Sasson & Taylor, 2008). Assim, células endometriais viáveis chegariam à cavidade peritoneal e originariam tecido ectópico. Esta teoria não consegue explicar o aparecimento de lesões de endometriose fora da cavidade pélvica; uma alternativa seria a contribuição de MSCs em circulação no desenvolvimento destas lesões (Alcaraz *et al.*, 2009). Uma hipótese de contribuição de SSCs seria a sua descamação através da menstruação. De facto, no sangue menstrual foi identificada uma população celular de características estaminais (Rossignoli *et al.*, 2013). Lesões endometrióticas que regredem poderão ter origem em células TA, enquanto que lesões permanentes poderão ter origem nas células endometriais estaminais ou progenitoras. Não se sabe se células de propriedades estaminais existem em maior número em mulheres com endometriose, mas são encontradas no seu tecido uterino e foram caracterizadas relativamente à sua capacidade formadora de colónias e expressão de algumas proteínas e genes (Gargett & Masuda, 2010; Li, He, Liu, Wang, & Pu, 2014; Sasson & Taylor, 2008).

A adenomiose é uma situação em que existe desenvolvimento de tecido endometrial no miométrio e a sua patologia também é desconhecida, postulando-se que haja um mecanismo de lesão na junção endométrio-miométrio seguido de reparação tecidual que resulta em aumento do peristaltismo uterino e permite assim o desenvolvimento de tecido endometrial nas camadas do miométrio; uma vez que as células estaminais somáticas estão implicadas nos mecanismos de regeneração, poderão ter um papel no desenvolvimento das lesões ectópicas (Alcaraz *et al.*, 2009; Gargett & Masuda, 2010).

#### **4. O potencial terapêutico das SSCs**

---

As capacidades funcionais das células estaminais tornam-nas atrativas para a sua utilização no campo da Medicina Regenerativa e Engenharia de Tecidos. A presença de SSCs tem sido investigada em vários tecidos e o seu estudo indica que têm um papel de relevo na homeostasia e regeneração destes. As SSCs têm ganho destaque porque comparativamente às ESCs têm um potencial tumorigénico diminuído (Fehrer & Lepperdinger, 2005; Gattegno-Ho *et al.*, 2012). Apesar de existirem muitas questões por responder, a capacidade de plasticidade possuída pelas células estaminais adultas pode ser mais um elemento facilitador na utilização de SSCs em termos clínicos (Wagers & Weissman, 2004).

Para além da aplicação clínica, a identificação e manutenção de SSCs de tecidos específicos oferece a possibilidade de serem usadas para ensaios de toxicidade e de outros fármacos de uma maneira mais específica e para o desenvolvimento de novos tratamentos (Gattegno-Ho *et al.*, 2012).

Atualmente é comum a utilização de HSCs positivas para o marcador CD34 em condições relacionadas com a medula óssea, como é o caso de tumores (leucemias, linfomas) e pós-quimioterapia, sendo um tratamento injetável com células estaminais usado frequentemente em medicina humana. A administração de MSCs juntamente com HSCs parece melhorar a capacidade repopulacional da medula óssea, embora a sua integração na medula do hospedeiro aparente ser baixa (Caplan & Bruder, 2001; Deans & Moseley, 2000; Ohishi & Schipani, 2010).

Em relação às MSCs, a pesquisa indica que o seu número e funcionalidade nos tecidos esqueléticos tem influência na capacidade regenerativa destes (Caplan & Bruder, 2001). As MSCs têm capacidade de integração e migração através das camadas do cérebro, tal como os astrócitos e as NSCs, e não parecem originar inflamação ou rejeição celular, sugerindo que podem ser usadas de maneira autóloga para terapia celular ou génica (Azizi *et al.*, 1998). Também foram estudados modelos de enfarte do miocárdio em porcos e humanos

usando MSCs autólogas, tendo ambos os estudos revelado uma melhoria na função cardíaca. No caso do estudo realizado em porcos foi ainda demonstrada integração de MSCs no tecido cardíaco e a sua diferenciação (Tuan *et al.*, 2003). Existem ainda modelos animais de injeção de MSCs em ataque cardíaco e regeneração de menisco com resultados promissores (Gattegno-Ho *et al.*, 2012; Koch *et al.*, 2009). Em murganhos diabéticos que receberam MSCs por via endovenosa os níveis de glicémia diminuíram (Ohishi & Schipani, 2010).

Outros casos em estudo utilizam MSCs para introduzir genes exógenos no organismo, usando diversos vetores, sem que haja perda das propriedades estaminais (Peng, Tsang, Tabata, & Gao, 2012). Esta abordagem tem interesse em casos de disfunção genética como na *osteogenesis imperfecta*, doença em que existe incapacidade de produção de colagénio e em que o gene para o colagénio tipo I pode ser integrado nas MSCs dadoras e assim fornecido ao organismo hospedeiro (Caplan & Bruder, 2001). No murganho foi possível induzir a expressão parcial de distrofina em ratos *mdx* (modelo da distrofia muscular de Duchenne) usando injeção endovenosa de HSCs ou células potencialmente estaminais obtidas a partir do músculo de murganhos não *mdx* (Gussoni *et al.*, 1999).

Como vários estudos indicam, as MSCs têm uma baixa taxa de implantação nos tecidos lesionados, mas o seu potencial terapêutico não parece estar relacionado com o número de células que se integram no tecido e sofrem transdiferenciação. Pensa-se que o seu efeito regenerativo esteja relacionado com a produção de fatores solúveis que alteram o microambiente, verificando-se a produção *in vitro* de uma série de fatores relacionados com vários processos biológicos, como a angiogénese, produção de péptidos neuroreguladores e citocinas importantes nos processos de inflamação e reparação; parecem ainda inibir os processos de apoptose e estimular o crescimento das células do hospedeiro (Caplan, 2007; Ohishi & Schipani, 2010; Phinney, 2007).

As MSCs possuem características imunomoduladoras e têm a capacidade de evitar o reconhecimento imunitário (Rasmusson, 2006). Estas células parecem ser imunoprivilegiadas, aparentando não originar rejeição por parte do hospedeiro, como suportado por um estudo com MSCs caninas usando MHC incompatíveis ou estudos alogénicos sem utilização de fármacos imunossupressores (Caplan & Bruder, 2001; Vater *et al.*, 2011). A ausência de moléculas MHC-II nas MSCs permite que evitem o reconhecimento por células T, tornando possível a sua utilização de maneira alogénica (Barberini *et al.*, 2014). As propriedades imunomoduladoras das MSCs têm originado estudos no âmbito de doenças de origem inflamatória ou imunológica, e no caso dos equinos, poderá abrir novas portas na investigação de doenças como a uveíte recorrente e a encefalomiopatia devida ao herpesvírus equino (Koch *et al.*, 2009). As MSCs têm capacidade moduladora através da

produção de moléculas solúveis, sendo várias estudadas, embora a hipótese de ser necessário contacto célula-a-célula não seja excluída (Chamberlain, Fox, Ashton, & Middleton, 2007; Rasmusson, 2006). São capazes de modular funções específicas dos linfócitos T *in vitro* e também há indicações de que têm efeitos moduladores nos linfócitos B, células dendríticas e células imunitárias com capacidade citotóxica (Ohishi & Schipani, 2010; Rasmusson, 2006; Vater *et al.*, 2011). Assim, podem ser úteis em condições autoimunes ou rejeição de transplantes (Jones & McTaggart, 2008). Existem ensaios clínicos realizados em doenças autoimunes como a doença de Crohn e a doença enxerto contra o hospedeiro (em inglês, *graft-versus-host-disease*) (Caplan, 2007; Kebriaei & Robinson, 2011)

Nos equinos as células estaminais têm sido utilizadas em doenças músculo-esqueléticas. Existem evidências que suportam a sua aplicação, ainda que não existam muitos estudos a longo prazo que comprovem a sua clara eficácia. Para este fim são usadas preferencialmente MSCs obtidas a partir da medula óssea e do tecido adiposo.

Existem estudos experimentais e clínicos de MSCs da medula óssea usados em casos de tendinite, tendo alguns sugerido uma diminuição na taxa de reincidência de lesão (Schnabel, Fortier, Wayne McIlwraith, & Nobert, 2013). Em casos de osteoartrite e outras lesões cartilagueas tanto MSCs da medula óssea como do tecido adiposo têm sido estudadas e as primeiras parecem ter melhores resultados (Frisbie & Smith, 2010). Em modelos experimentais de osteoartrite não se encontraram diferenças entre as cartilagens de animais tratados com MSCs da medula óssea ou derivadas do tecido adiposo. No entanto, as articulações tratadas com as MSCs da medula apresentaram menos distensão sinovial e menores concentrações de prostaglandinas pró-inflamatórias, enquanto que as tratadas com células derivadas do tecido adiposo revelaram maiores valores de TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor alpha*), sugerindo resposta inflamatória (Frisbie & Smith, 2010).

## **5. A endometrose na égua**

---

A degeneração endometrial crónica, fibrose periglandular endometrial ou endometrose, termo introduzido por Kenney em 1992, é um processo patológico que ocorre nos equídeos em que existe fibrose do endométrio e dilatação quística das glândulas endometriais (Snider *et al.*, 2011). Atualmente é definida como fibrose endometrial que pode ser ativa ou inativa, periglandular e/ou do estroma, podendo afetar apenas uma glândula ou várias glândulas (Hoffmann *et al.*, 2009). A endometrose é uma importante causa de infertilidade na égua, possivelmente pela alteração da capacidade de produção de histotrofo pelo endométrio, o que resulta na perda embrionária (Hoffmann *et al.*, 2009; Lehmann *et al.*, 2011). No entanto, pouco é conhecido sobre a sua etiologia e patogénese (Hoffmann *et al.*, 2009). A

endometrose está relacionada com a idade da égua, sendo mais grave nas éguas mais velhas, mas não existe uma relação com o número de partos e a sua progressão não parece ser influenciada pelas alterações hormonais cíclicas ou sazonais (Hoffmann *et al.*, 2009; Lehmann *et al.*, 2011). Por outro lado, inflamação crónica e problemas endócrinos podem contribuir para o início e progressão desta doença (Aresu *et al.*, 2012). Ainda que a inflamação crónica possa desencadear a fibrose, a partir de um determinado ponto o processo torna-se independente da inflamação, pelo que esta tem pouca relação com o grau de endometrose (Aresu *et al.*, 2012). A fibrose presente é permanente, enquanto que a inflamação pode ser transitória (Kenney & Doig, 1986). O epitélio das glândulas uterinas é influenciado pelos níveis de hormonas esteroides. As glândulas afetadas por fibrose podem apresentar alterações síncronas ou assíncronas com a fase do ciclo éstrico e podem detetar-se alterações nos níveis de enzimas e glucoconjugados epiteliais em focos fibróticos comparados com glândulas sem fibrose (Hoffmann *et al.*, 2009).

A endometrose é avaliada através de biópsia uterina. A fibrose presente pode ser classificada quanto ao seu grau (número de camadas de colagénio periglandulares) ou frequência (número de focos fibróticos por campo linear) (Kenney & Doig, 1986). Kenney criou uma escala de três categorias em 1978 considerando a incidência e grau de extensão das lesões bem como a probabilidade de nascimento de um poldro vivo (Kenney, 1978). Esta escala está esquematizada na Tabela 4.

Tabela 4 Categorias de endometrose de acordo com Kenney (1978).

| <b>Categoria</b> | <b>Principais características</b>  | <b>Taxa de nascimento esperada (%)</b> |
|------------------|--|--|
| <b>I</b>         | Sem alterações consideradas patológicas ou com alterações ligeiras e dispersas.  | 70-92%                                 |
| <b>II</b>        | Alterações inflamatórias: infiltração ligeira ou moderada do estrato compacto de células inflamatórias, ou focos inflamatórios dispersos mas frequentes no estrato compacto e esponjoso.<br>Alterações fibróticas: envolvimento frequente de ramos de uma glândula individual (mesmo de maneira dispersa) ou acumulação de até 3 ninhos glandulares por campo linear de 5,5 mm (avaliação mínima de 4 campos). | 50-67%                                 |
| <b>III</b>       | Alterações irreversíveis: fibrose periglandular extensa (5 ou mais ninhos glandulares por campo linear de 5,5 mm, avaliando um mínimo de 4 campos). Infiltração inflamatória extensa.  | <10%                                   |



A escala de Kenney foi posteriormente modificada e completa, criando-se duas subcategorias da categoria II da escala original, resultando na escala de Kenney-Doig que é considerada a escala internacional padrão (esquematizada na Tabela 5).

Tabela 5 Escala de Kenney-Doig, adaptada de Snider *et al.* (2001).

| Categoria | Principais características  | Taxa de gestação esperada (%) |
|-----------|---|-------------------------------|
| I         | Endométrio normal; inflamação ou fibrose raras e dispersas  | 80-90                         |
| IIA       | Inflamação ligeira e dispersa; fibrose ligeira; atrofia do endométrio no final da época reprodutiva | 50-80                         |
| IIB       | Inflamação moderada e dispersa; fibrose moderada  | 10-50                         |
| III       | Alterações graves e irreversíveis, incluindo fibrose e inflamação                                   | 10                            |

No entanto, estas escalas não têm em conta outras alterações encontradas histologicamente, como o grau de alterações angiogénicas ou de maldiferenciação uterina (Snider *et al.*, 2011). Em endométrios da categoria I os primeiros sinais de desenvolvimento de fibrose são as alterações morfológicas das células do estroma periglandular, que se tornam grandes e poligonais, produzindo fibras de colagénio. Na categoria II, surge a presença significativa de miofibroblastos e as células do estroma podem estar metabolicamente ativas ou inativas. Os miofibroblastos podem ser responsáveis pela dilatação glandular devido às suas propriedades contrácteis, e podem ainda afetar a matriz extracelular devido aos diferentes mediadores que são capazes de produzir (Hoffmann *et al.*, 2009). A expressão de TGF- $\beta$ 1 no útero aumenta com maiores graus de endometrose e esta molécula foi implicada na transformação dos fibroblastos em miofibroblastos (Ganjam & Evans, 2006). A deposição de fibras de colagénio na região periglandular e subepitelial está relacionada com lesão celular e alteração da secreção glandular, podendo surgir atrofia ou hipertrofia das células epiteliais (Szóstek *et al.*, 2012).

O estudo de SSCs no útero da égua pode fornecer novos dados sobre a biologia uterina e o problema da endometrose, especialmente considerando que até ao momento não se tentaram detetar células de características estaminais no útero da égua e vários tipos de células envolvidos no processo de fibrose podem ter ligação a células estaminais de origem mesenquimal. Para além disto, na mulher tem sido sugerido que as SSCs podem estar implicadas no desenvolvimento de vários processos patológicos, pelo que tal poderá ser possível também na égua.

### III. TRABALHO DE INVESTIGAÇÃO

#### 1. Objetivos

---

O presente trabalho é parte integrante do projeto “Células somáticas estaminais no endométrio da égua: uma nova abordagem para a compreensão da fibrose?”, financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia e desenvolvido no laboratório de Fisiologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-Ulisboa) em parceria com a *Fundación IVI* (Valência, Espanha) e o *Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences* (Olsztyn, Polónia).

O objetivo do projeto é avaliar a existência de células SP no endométrio da égua e sua caracterização baseada na capacidade formadora de colónias, no potencial de diferenciação osteogénico e adipogénico e na presença de marcadores de células estaminais. O presente trabalho consiste no isolamento de células do endométrio e na avaliação da presença de células SP em diferentes populações celulares. Identificando-se uma população SP, pretende-se relacioná-la com diferentes fases do ciclo éstrico da égua e diferentes graus de fibrose do endométrio, uma vez que se suspeita que as células estaminais somáticas presentes no útero de outras espécies possam estar relacionadas com processos patológicos que se desenvolvem nesse órgão.

Assim sendo, os objetivos deste trabalho consistem em:

- Isolar células da fração epitelial e do estroma de endométrios de éguas obtidos *post-mortem* em determinadas fases do ciclo éstrico (confirmadas por análise macroscópica do ovário), com diferentes graus de fibrose endometrial (de acordo com a escala de Kenney) avaliados por análise histopatológica.
- Determinar em cada uma das frações endometriais a presença ou ausência de células com o fenótipo SP através de coloração Hoechst33342 e citometria de fluxo.
- Isolar as populações SP e NSP através da utilização de janelas (“*gates*”) consecutivas e separá-las por citometria de fluxo.
- Estudar a capacidade formadora de colónias das populações SP e NSP com diferentes densidades celulares.

## 2. Materiais e métodos

---

Para este estudo foram utilizados onze úteros de égua obtidos *post-mortem* dos quais se isolaram células do endométrio. Em oito dos úteros fez-se separação da fração epitelial e do estroma. Nove dos úteros foram avaliados para a presença de células SP e NSP, enquanto que as células obtidas dos restantes dois úteros foram criopreservadas para análise posterior.

Após a recolha dos órgãos reprodutores no matadouro estes foram transportados para o laboratório da FMV-ULisboa a 4°C em PBS (*phosphate buffered saline*) com penicilina/estreptomicina (Gibco) e anfotericina B (Sigma-Aldrich) usados a 1%. Os úteros foram processados dentro de um período máximo de três horas após o abate.

No laboratório foi determinada a fase do ciclo éstrico das éguas com base na presença de folículos e/ou corpos lúteos nos ovários. Amostras de endométrio foram fixadas em 4% de formol tamponado para posterior caracterização segundo a classificação de Kenney (1978).

### 2.1. Isolamento de células do útero para obtenção de células do epitélio e do estroma

---

Após a avaliação macroscópica dos endométrios, estes foram processados de acordo com o protocolo de Cervelló<sup>1</sup>. Os fragmentos de tecido foram digeridos com collagenase (Sigma-Aldrich), tratados com solução de lise de eritrócitos de cloreto de amónia e as duas frações celulares foram obtidas por combinação de técnicas de sedimentação e filtração. Este protocolo de isolamento permitiu obter duas frações celulares em oito éguas: uma fração enriquecida em células do estroma e uma fração enriquecida em células do epitélio. Em três das onze amostras o passo de filtração foi alterado, impedindo a obtenção das duas frações. Assim, desses três úteros obteve-se uma mistura de células (epiteliais e de estroma) do endométrio.

Após a sua obtenção, as células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade foi avaliada com azul tripano (Sigma-Aldrich), que foi adicionado à suspensão celular numa proporção de 1:1. Depois da contagem, cinco amostras de células endometriais foram sujeitas a coloração Hoechst: três populações mistas de células do endométrio, correspondentes a três éguas, e as frações de estroma e epitélio de uma égua; outra amostra de epitélio dessa mesma égua, bem como as catorze frações endometriais das restantes sete éguas, foram criopreservados em DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle's*

---

<sup>1</sup> Descrição resumida devido a acordo de confidencialidade. Cervelló, I., Gil, C., Faus, A., Simón, S. (2014). "SOP: Separation of human endometrial epithelial and stromal cells. Side Population method". Fundación IVI, Universitat de Valencia

*Medium/Nutrient F-12 Ham*, Sigma-Aldrich) com 10% de DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich) e 10-50% de *Fetal Bovine Serum* (FBS, HyClone™, ThermoScientific) para análise posterior. Este processamento está ilustrado na Tabela 6.

Tabela 6 Frações endometriais obtidas por amostra e posterior processamento.

| Amostra   | Frações endometriais                     | Processamento posterior   |
|---|--|---|
| 02/2014<br>03/2014<br>04/2014                       | População mista de células do endométrio | Coloração Hoechst   |
| 09/2014   | Fração epitelial + fração do estroma     | Estroma: coloração Hoechst<br>Epitélio: coloração a fresco;<br>criopreservação com coloração<br>Hoechst posterior |
| 19/2014<br>23/2014<br>26/2014<br>30/2014<br>34/2014 |  | Criopreservação com posterior<br>coloração Hoechst  |
| 40/2014<br>44/2014                                  |  | Criopreservação   |

Das amostras em que se obteve uma população celular mista do endométrio foram processados 4 mL de tecido uterino, o mesmo acontecendo numa das amostras em que se fez separação do estroma e do epitélio. Nas restantes amostras foram processados 12 mL de tecido.

## 2.2. Coloração Hoechst

Para se visualizarem as células SP e NSP de cada fração celular realizou-se a coloração Hoechst para posterior análise por citometria de fluxo.

Das quinze amostras criopreservadas, onze (cinco de estroma e seis de epitélio) foram coradas com Hoechst33342 (AppliChem). Neste caso, a descongelação foi feita em banho-maria a 37°C seguida de centrifugação e ressuspensão em DMEM/F12 com FBS. Realizou-se contagem celular em câmara de Neubauer usando azul tripano, como descrito

anteriormente. As restantes amostras (três misturas de células do endométrio, uma fração do estroma e uma fração do epitélio) foram coradas após o passo de contagem realizado no procedimento de isolamento celular (capítulo III-2.1).

Cada amostra a examinar foi distribuída por três tubos de incubação numa concentração de  $1 \times 10^6$  cél/mL. O primeiro tubo serviu para calibração e não foi incubado nem com Hoechst33342 nem com verapamil; um segundo tubo foi incubado com Hoechst33342 e verapamil, sendo usado para confirmar a fração SP; o terceiro tubo, correspondente à amostra para separação, foi incubado apenas com Hoechst33342. Esta distribuição está ilustrada na Figura 9. As três amostras de populações de endométrio mistas foram utilizadas com diferentes concentrações de Hoechst e tempos de incubação para otimização do processo. As restantes amostras foram incubadas após otimização, de acordo com os seguintes parâmetros: concentração de Hoechst33342 de 10 µg/mL; concentração de verapamil (Sigma-Aldrich) de 100 µM; tempo de incubação de 90-110 minutos a uma temperatura de 37°C.

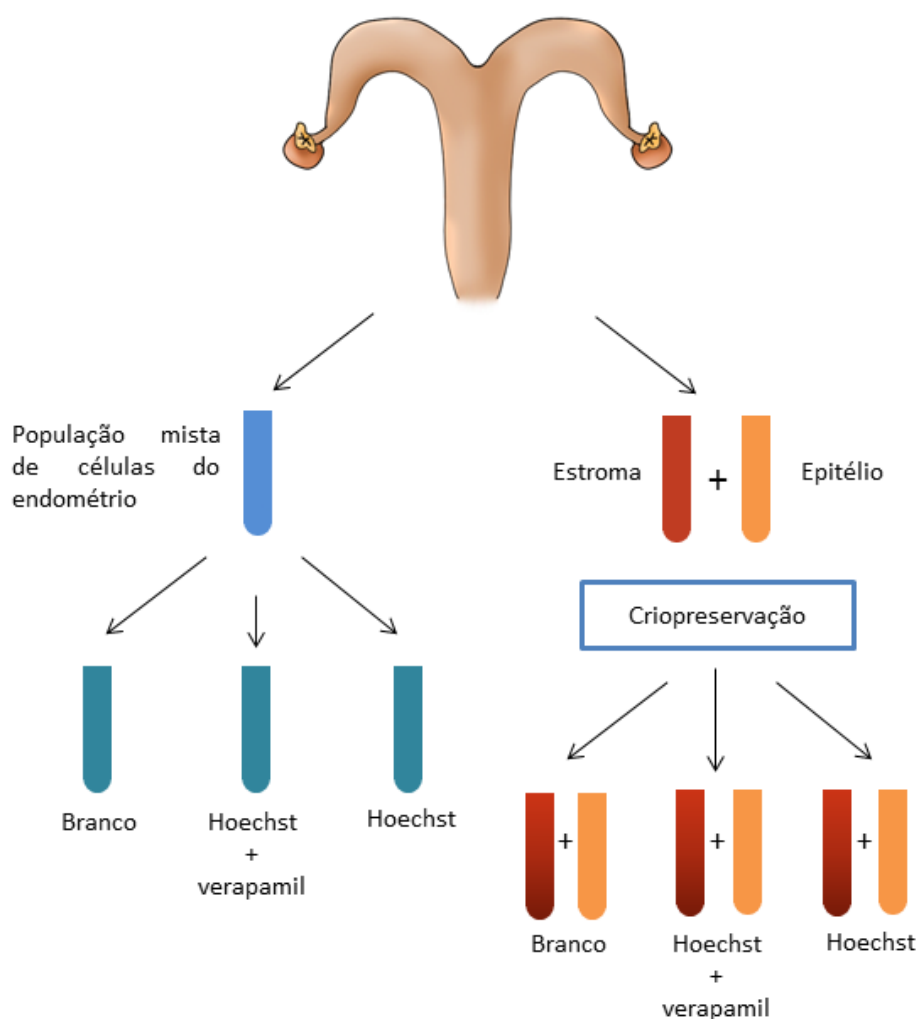


Figura 9 Esquema de incubação dos diferentes tipos de amostra com Hoechst. A mesma amostra foi incubada sem Hoechst, com Hoechst ou com adição simultânea de Hoechst e verapamil.

Após a incubação, as células foram ressuspensas em HBSS+ (*Hank's Balanced Salt Solution*, Sigma-Aldrich, com 2% de FBS e HEPES (Sigma-Aldrich) a 10 mM) a 4° e mantidas em gelo até à sua análise no citómetro. Para diferenciar as células vivas das mortas, foi adicionado iodeto de propídio (AppliChem) numa concentração de 5 µg/mL.

### **2.3. Isolamento das populações SP e NSP através de citometria de fluxo**

---

As amostras foram analisadas no citómetro de fluxo BC MoFlo© (Beckman Coulter), equipado com um laser UV Coherent Innova I90C Argon multiline (80 mW de output) para excitação do Hoechst33342 e um laser 488 nm Coherent Sapphire 488-200 CDRH (140 mW de *output*), que foi usado para excitar o iodeto de propídio. Para detetar a radiação vermelha do Hoechst foi usado um filtro 645 LP; para a radiação azul do Hoechst foi usado um filtro Z440/20 BP e para o iodeto de propídio utilizou-se um filtro 670/40 BP.

A estratégia de criação de janelas para visualização das populações celulares está esquematizada na Figura 11 e foi a seguinte:

1. Seleção de partículas correspondentes a células, excluindo detritos celulares e outras partículas, num gráfico de FSC em escala linear no eixo horizontal e SSC em escala logarítmica no eixo vertical.
2. Seleção de partículas correspondentes a células únicas, excluindo agregados, num gráfico de FSC em escala linear (eixo horizontal) contra amplitude de pulso (eixo vertical).
3. Seleção de células viáveis usando a fluorescência do iodeto de propídio avaliada a dois intervalos de comprimento de onda em escala logarítmica, captados por um filtro 585/40 BP (eixo horizontal) e por um filtro 670/40 BP (eixo vertical).
4. Avaliação das partículas com as duas frequências de emissão de radiação do Hoechst, realizando-se mais um passo de exclusão de células mortas num gráfico em escala linear da radiação vermelha (captada por um filtro 645 LP) no eixo horizontal e da radiação azul (captada por um filtro 440/20 BP) no eixo vertical.
5. Definição da população SP e da população NSP num gráfico com os mesmos eixos de 4.

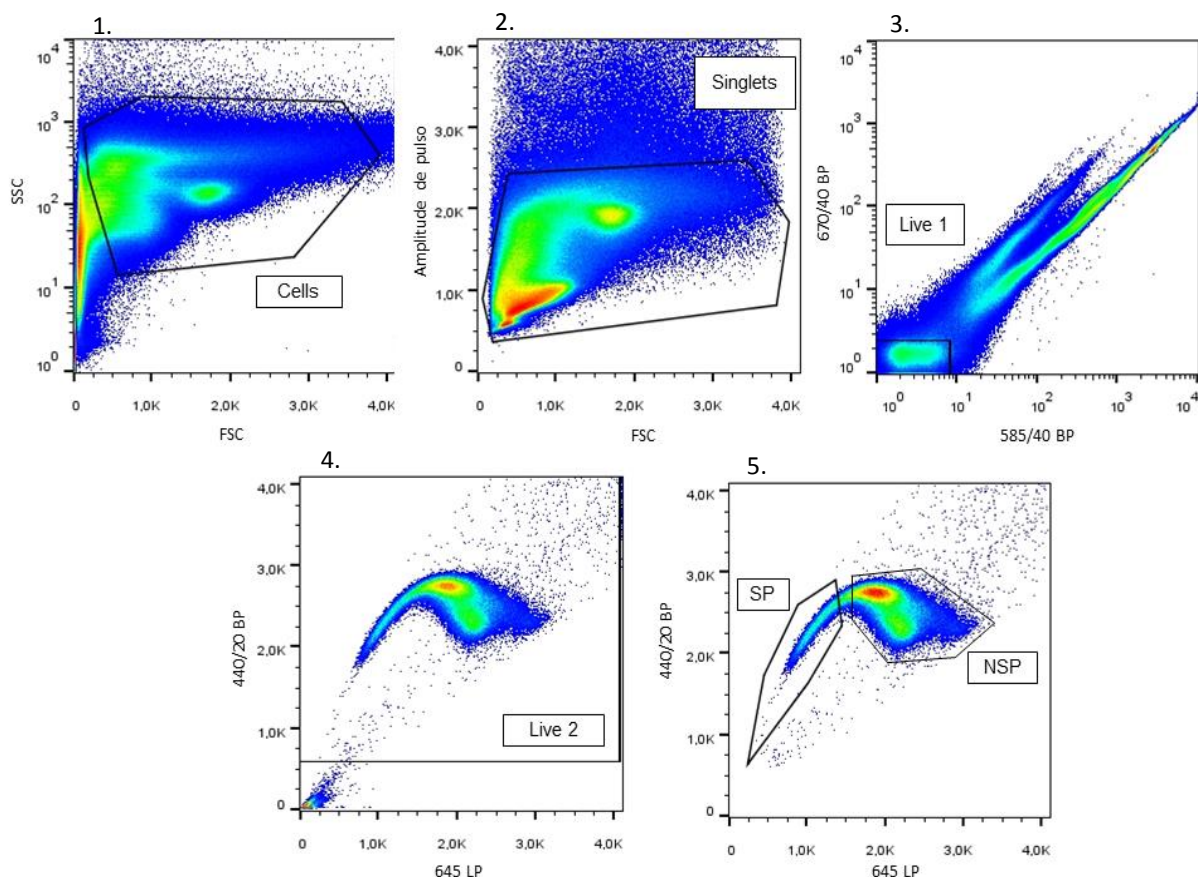


Figura 10 Estratégia de criação de *gates* (janelas) usadas em citometria de fluxo.

1. Seleção de células; 2. Seleção de células únicas; 3. Seleção de células vivas; 4. Seleção mais restrita de células vivas; 5. Definição das populações SP e NSP.

As células SP e NSP foram colhidas para microtubos contendo meio de cultura constituído por  $\alpha$ -MEM (*alpha modification of Minimum Essential Medium Eagle*, Sigma-Aldrich), HyClone™ a 10%, penicilina/estreptomicina e anfotericina B a 2%, aminoácidos não essenciais (Gibco) e Glutamax™ (Gibco) a 1%.

O programa usado para análise dos dados de citometria foi o FlowJo™, enquanto que o Microsoft Excel™ 2010 e o Statistica™ 8 foram usados para a análise estatística.

## 2.4. Cultura de células SP e NSP a densidades celulares definidas

Após a obtenção de células SP e NSP por citometria de fluxo, foram utilizadas placas de 24 pocilhos gelatinizadas (usando gelatina tipo B: da pele de bovino, Sigma-Aldrich) para cultivar as células SP e NSP de cinco endométrios a duas, três ou quatro densidades celulares diferentes (limitado pela quantidade total de células obtidas por citometria), em

triplicado, de acordo com o desenho experimental da Figura 11. As densidades de plaqueamento foram as seguintes: 10 células/cm<sup>2</sup>, 20 células/cm<sup>2</sup>, 200 células/cm<sup>2</sup> e >600 células/cm<sup>2</sup>.

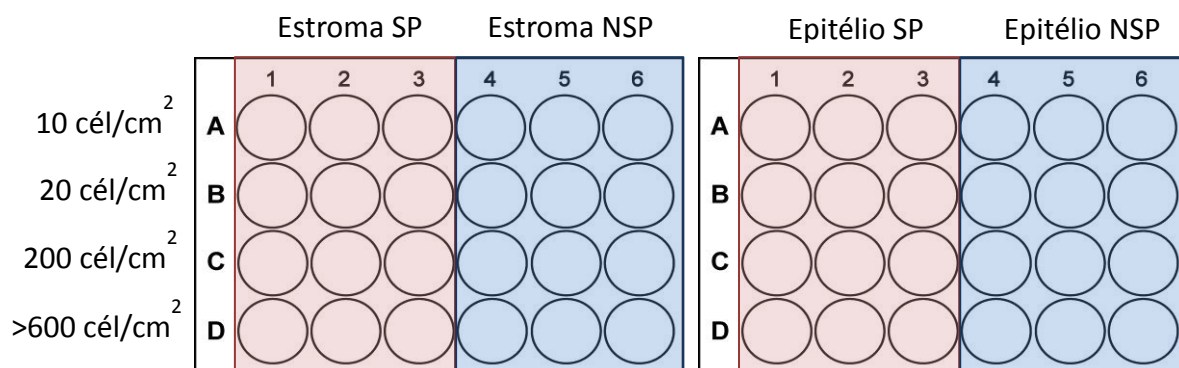


Figura 11 Esquema das placas de 24 pocilhos para cultura de células SP e NSP de estroma e epitélio a densidades celulares definidas.

O meio de cultura usado foi constituído por  $\alpha$ -MEM, HyClone<sup>TM</sup> a 10% e penicilina/estreptomicina, anfotericina B, aminoácidos não essenciais e Glutamax<sup>TM</sup> usados a 1%. O crescimento nas primeiras 24-36 horas após a citometria foi feito a 37°C em atmosfera normal e 5% de CO<sub>2</sub>. No fim desse período o meio foi e selaram-se as culturas em atmosfera de hipóxia contendo 5% de oxigénio. De cinco em cinco ou de seis em seis dias realizou-se a troca completa de meio e selagem das placas em hipóxia até perfazer 20-27 dias de crescimento. Após este período, o meio foi removido, os pocilhos foram lavados com PBS e as células foram fixadas e coradas de acordo com o seguinte protocolo:

1. Adição de metanol a 100% (Merck) e PBS na proporção de 1:1 e incubação durante 15 minutos à temperatura ambiente.
2. Remoção e adição de metanol a 100%, seguida de 15 minutos de incubação (temperatura ambiente).
3. Remoção do metanol e adição de azul de toluidina a 1% (Sigma-Aldrich), com incubação de 30 minutos.
4. Remoção do azul de toluidina dos pocilhos por imersão das placas em água.
5. Confirmação da coloração das células por observação ao microscópio e inversão da placa para ficar a secar em local seco e resguardado.

Posteriormente foi possível observar as células coradas de azul usando microscópio de contraste de fase (Olympus CK40).



#### 2.4.1. Cultura em hipóxia e normóxia

---

Para uma das amostras de epitélio, foi realizada cultura de células NSP em hipóxia e em normóxia, utilizando o meio de cultura anteriormente descrito. A placa cultivada em hipóxia seguiu o desenho descrito na Figura 11. A placa cultivada em normóxia seguiu as densidades celulares esquematizadas mas apenas foram cultivadas células NSP de epitélio, preenchendo as colunas 4 e 5 da segunda placa.

Após 20 dias de cultura, as células foram fixadas, coradas e analisadas como descrito anteriormente.

#### 2.4.2. Cultura em placa de 6 e 24 pocilhos

---

Para uma das amostras foi realizada cultura de células NSP do estroma e do epitélio em placa de 6 pocilhos e de 24 pocilhos, utilizando o meio de cultura descrito previamente. As placas de 24 pocilhos foram desenhadas de acordo com o esquema referido na Figura 11. A placa de 6 pocilhos foi desenhada de acordo com o esquema da Figura 12.

Após um período de cultura de 24 dias, as células foram fixadas, coradas e analisadas como descrito anteriormente.

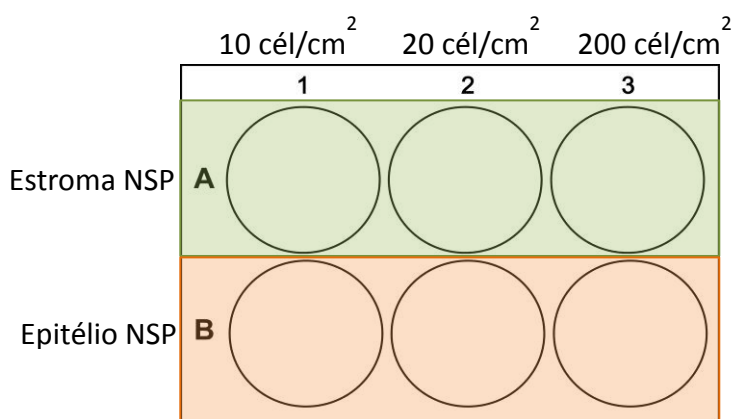


Figura 12 Esquema da placa de 6 pocilhos com as densidades celulares e as populações utilizadas.

### 3. Resultados

Dos onze úteros colhidos fez-se isolamento celular e em oito deles foi possível obter células do estroma e do epitélio do endométrio. Nove dos onze endométrios foram analisados por citometria de fluxo e as células obtidas dos outros dois úteros foram criopreservadas. A Tabela 7 refere as fases do ciclo éstrico das éguas e a classificação do endométrio de acordo com a escala de Kenney (1978):

Tabela 7 Classificação da fase do ciclo éstrico e do grau de endometrose das amostras utilizadas.

| Amostra | Fase do ciclo éstrico | Classificação de Kenney |
|---------|-----------------------|-------------------------|
| 02/2014 | Fase folicular        | III                     |
| 03/2014 | Fase folicular        | III                     |
| 04/2014 | Fase folicular        | II                      |
| 09/2014 | Fase folicular        | III                     |
| 19/2014 | Fase folicular        | II                      |
| 23/2014 | Fase lútea            | III                     |
| 26/2014 | Fase folicular        | II                      |
| 30/2014 | Fase lútea            | I                       |
| 34/2014 | Fase lútea            | II                      |
| 40/2014 | Fase folicular        | I                       |
| 44/2014 | Fase folicular        | II                      |

#### 3.1. Isolamento de células endometriais

Nas três amostras em que se obteve uma população mista de células do endométrio conseguiram-se em média  $39,23 \times 10^6 \pm 39,01 \times 10^6$  (média  $\pm$  desvio-padrão) células. Tendo em conta o volume total de tecido processado inicialmente, quando se obteve uma população mista de células do endométrio o rendimento médio foi de  $9,81 \times 10^6 \pm 9,76 \times 10^6$  células/mL de tecido endometrial, enquanto que para o estroma este valor foi de  $29,84 \times 10^6 \pm 31,55 \times 10^6$  células/mL de tecido e para o epitélio foi de  $14,03 \times 10^6 \pm 8,35 \times 10^6$  células/mL de tecido, não existindo diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). Relativamente a sete amostras em que o volume de tecido processado foi igual (12 mL) foi possível obter em média  $125,61 \times 10^6 \pm 84,13 \times 10^6$  células de estroma e  $89,64 \times 10^6 \pm 63,25 \times 10^6$  células de epitélio.

Para tentar compreender se a fase do ciclo éstrico estaria relacionada com o número de células obtidas a partir do estroma ou do epitélio, as amostras com volumes de tecido endometrial inicial semelhantes foram analisadas ( $n=7$ ). Três éguas estavam na fase lútea e quatro na fase folicular. Na Figura 13 estão representados os valores médios de células

viáveis de estroma ou epitélio, distribuídos por fase do ciclo éstrico. Na fase lútea, o número médio de células viáveis obtidas a partir do epitélio é inferior ao número médio de células do estroma na correspondente fase ( $p<0,05$ ). Não existem diferenças significativas entre o número de células obtido a partir da mesma fração na fase lútea e na fase folicular ou entre as duas frações na fase folicular.

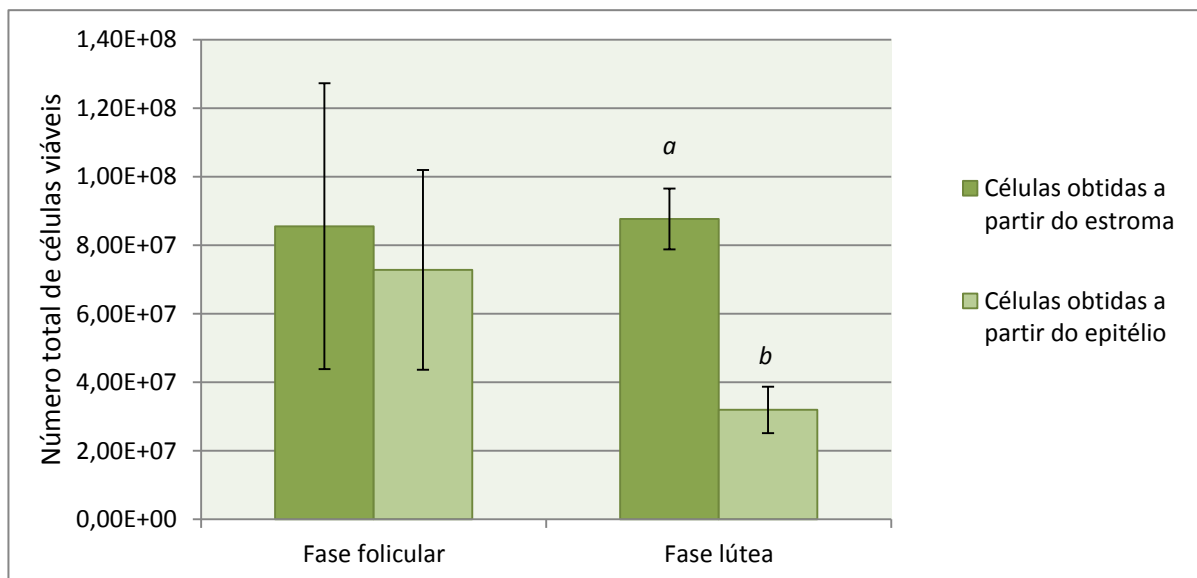


Figura 13 Número de células viáveis obtidas a partir do estroma e do epitélio distribuídas de acordo com a fase do ciclo éstrico. As barras representam a média  $\pm$  erro-padrão. *a* e *b* representam diferenças significativas ( $p<0,05$ ).

A viabilidade celular foi superior nas células obtidas a partir do estroma em todas as amostras analisadas, independentemente da fase do ciclo éstrico. Na fase folicular, a viabilidade média foi de  $75,91 \pm 1,50\%$  nas células do estroma e  $67,38 \pm 5,59\%$  nas do epitélio; na fase lútea foi de  $62,75 \pm 4,79\%$  nas células obtidas a partir do estroma e  $51,17 \pm 13,60\%$  nas do epitélio. Tendo em conta as fases do ciclo éstrico, a viabilidade das células obtidas do epitélio foi inferior na fase lútea ( $p<0,05$ ), tal como a viabilidade das células do estroma ( $p<0,01$ ). Comparando as frações na mesma fase, nas amostras das células obtidas na fase folicular a viabilidade do estroma é significativamente superior à do epitélio ( $p<0,05$ ), embora não existam diferenças entre as duas frações na fase lútea. Estes resultados estão ilustrados na Figura 14.

O reduzido e variado número de amostras com graus de fibrose semelhantes para as diferentes populações do endométrio estudadas não permitiu a análise estatística dos dados, pelo que não foi possível estabelecer uma relação entre os diferentes graus de fibrose e a viabilidade celular ou número de células isoladas.

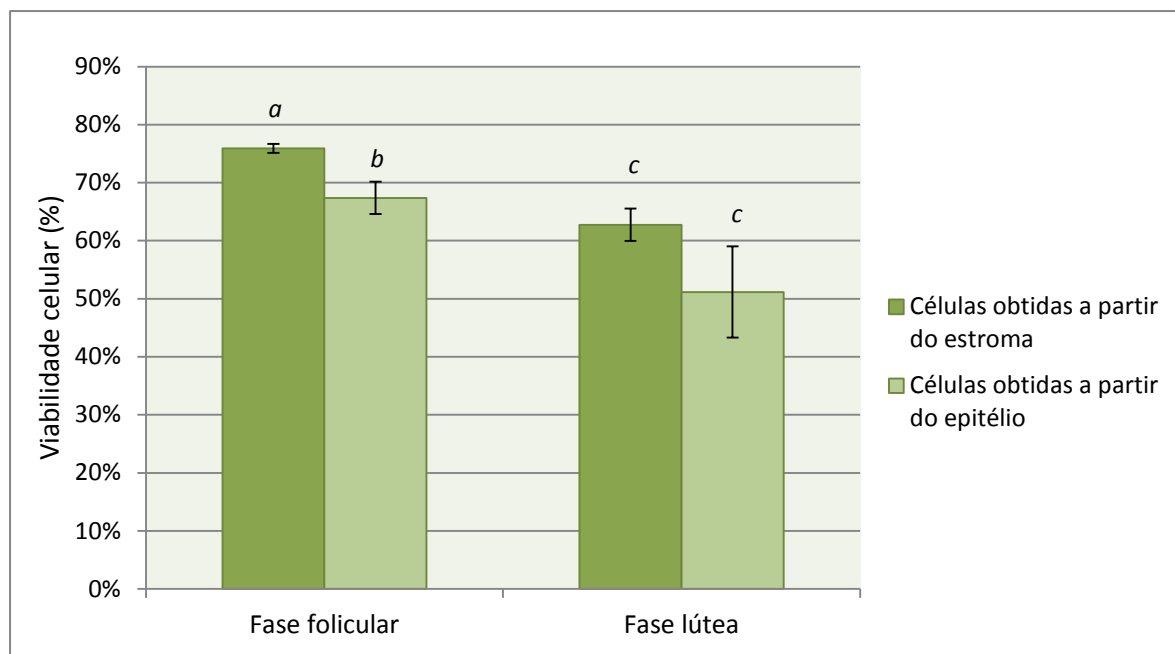


Figura 14 Viabilidade celular média das células obtidas a partir do estroma e do epitélio nas diferentes fases do ciclo éstrico. As barras representam média  $\pm$  erro-padrão. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas.

### 3.2. Identificação de células SP e NSP

Nove úteros foram avaliados para a presença de células SP e NSP, correspondendo ao todo a dezasseis amostras analisadas em citómetro (três populações celulares mistas de endométrio de três úteros, seis frações de células obtidas a partir do estroma de seis úteros e sete frações de células obtidas do epitélio de seis úteros).

A população SP foi identificada em todas as populações celulares mistas de endométrio, em seis amostras de células do estroma e seis de epitélio, usando verapamil como controlo negativo. Os resultados referentes às amostras de populações de células mistas, estroma e epitélio estão esquematizadas na Tabela 8. A média de células SP por endométrio (valor na população celular mista ou somatório de células SP na população do estroma e do epitélio do mesmo endométrio) foi de  $6,77 \pm 8,17\%$ , variando entre 1,3 e 21,6%.

Tabela 8 Dados relativos à avaliação da população SP das diferentes frações do endométrio equino.

| Fração celular                          | Número de amostras | Média (%) | Desvio-padrão ( $\pm\%$ ) |
|---|--------------------|-----------|---------------------------|
| População mista de células endometriais | 3                  | 2,78      | 2,01                      |
| Células obtidas do estroma              | 6                  | 3,90      | 3,68                      |
| Células obtidas do epitélio             | 7                  | 7,03      | 6,79                      |

Também se verificou que a adição de verapamil não eliminou por completo a população SP em nenhuma das amostras (Figura 15), surgindo em média  $0,97 \pm 1,52\%$  de células SP na presença de verapamil. No entanto, a média de células SP foi superior nas amostras incubadas sem verapamil quando comparada com as amostras incubadas com verapamil ( $p < 0,01$ ).

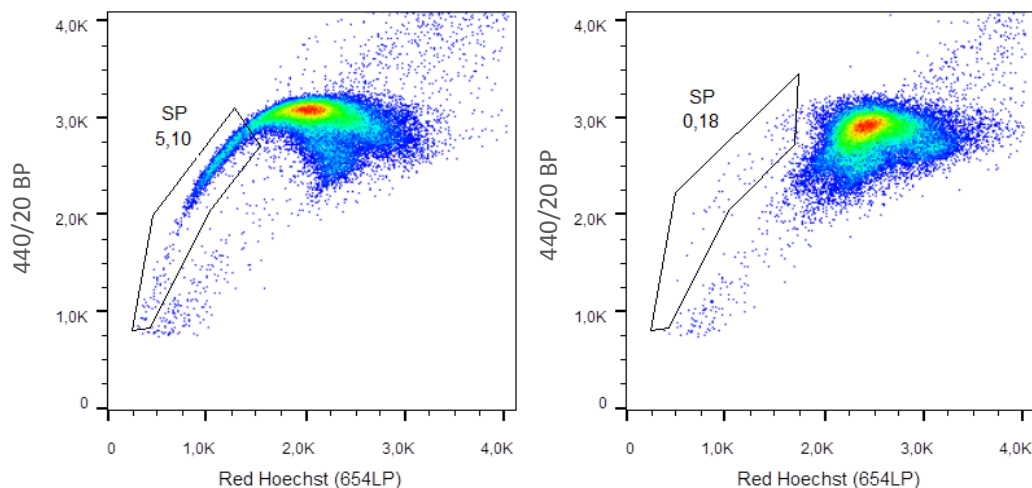


Figura 15 Comportamento da população SP na ausência (esquerda) ou na presença (direita) de verapamil. A proporção de células SP diminuiu na presença de verapamil mas não foi totalmente eliminada. O valor SP representa a percentagem de células do “gate” ativo.

No entanto, o padrão formado pela população celular foi atípico numa das amostras do epitélio (Figura 16), enquanto que no epitélio e estroma de outra amostra o controlo negativo com verapamil não permitiu a identificação da população SP (Figura 17).

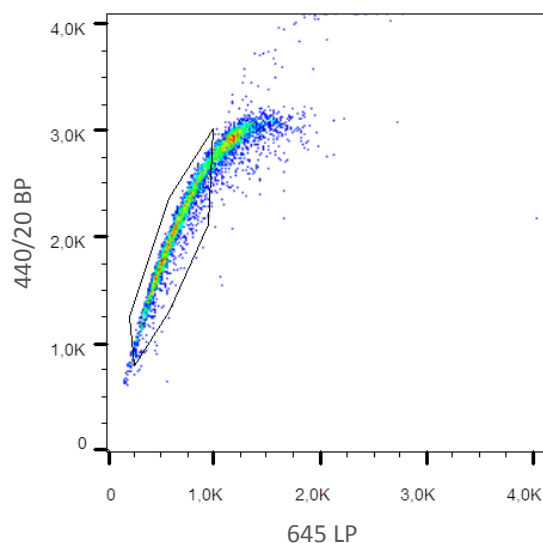


Figura 16 Amostra com padrão anormal de coloração. Nestas células obtidas do epitélio não houve definição de uma população principal. O polígono representa a área delimitada para a população SP na amostra emparelhada com adição de verapamil.

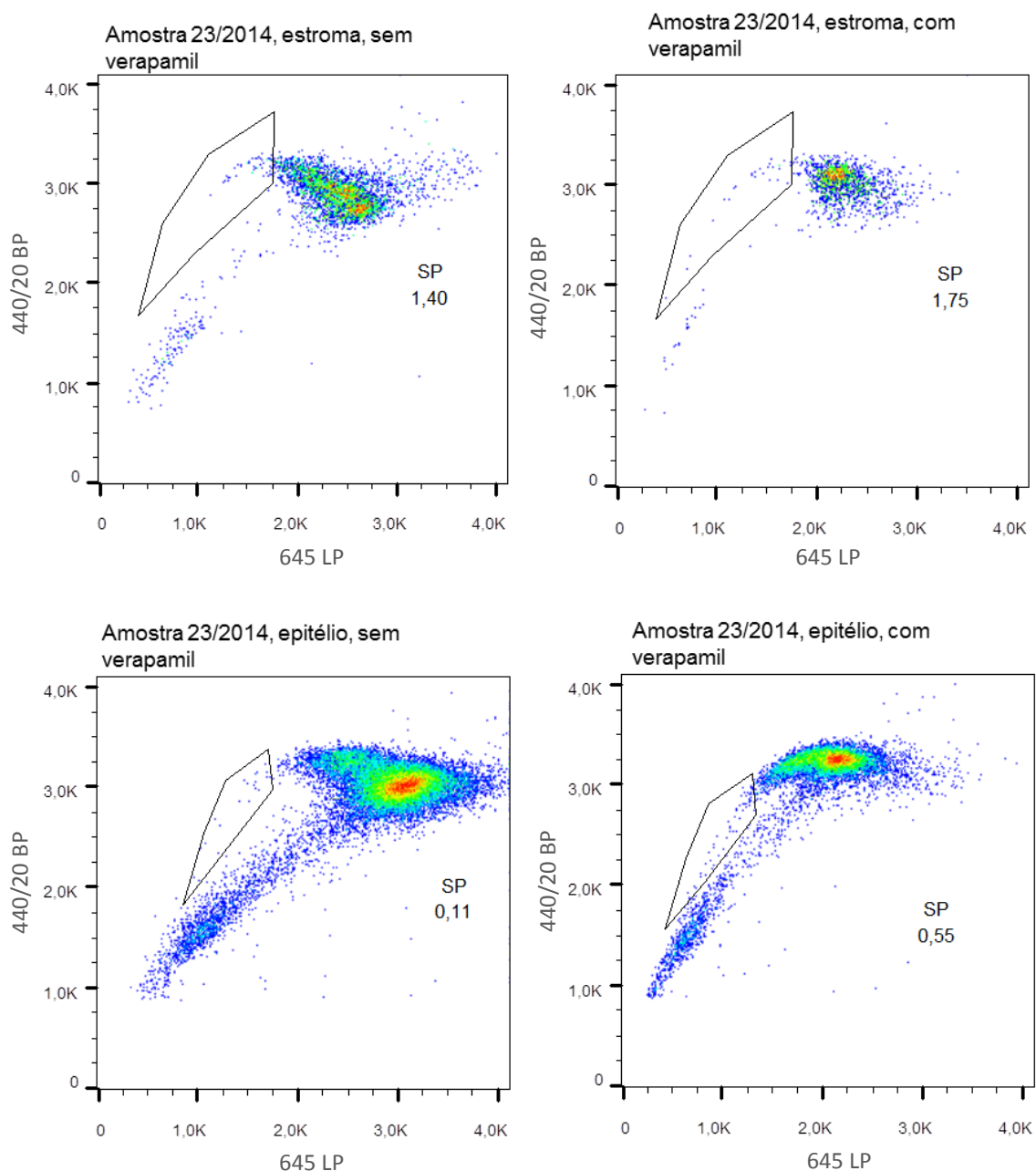


Figura 17 Inversão da proporção de células SP esperada nas amostras emparelhadas na ausência (esquerda) e na presença (direita) de verapamil, tanto em células obtidas a partir do estroma como do epitélio. O valor SP representa a percentagem de células no interior da região poligonal (seleção da população SP). A amostra de epitélio não foi separada em populações SP e NSP.

Analisando individualmente as populações obtidas a partir do estroma e do epitélio tendo em conta a fase do ciclo éstrico, verificou-se que existiam mais células SP tanto no epitélio da fase folicular ( $p < 0,001$ ) como no estroma da fase folicular ( $p < 0,01$ ), comparativamente às respetivas populações na fase lútea. Além disso, verificou-se que, na fase folicular, a proporção de células SP foi superior no epitélio em relação ao estroma ( $p < 0,01$ ), enquanto que não existem diferenças entre as duas frações na fase lútea (Figura 18).

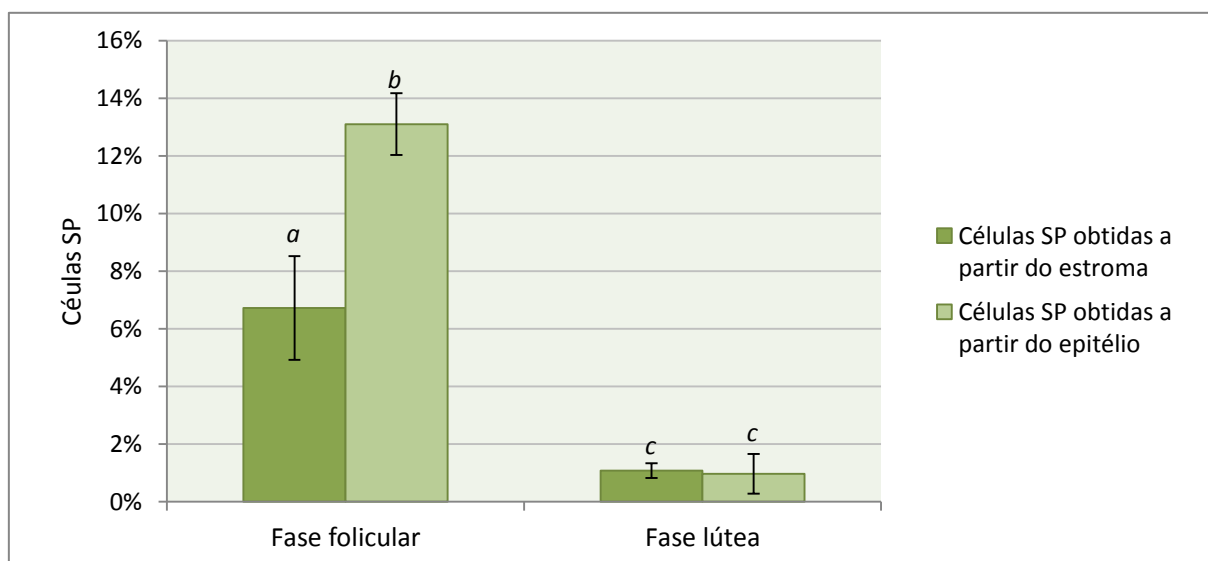


Figura 18 Proporção de células SP obtidas a partir do epitélio e do estroma de acordo com a fase do ciclo éstrico. As barras representam média  $\pm$  erro-padrão. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas.

A análise estatística da proporção de células obtidas nas diferentes populações celulares tendo em conta o grau de fibrose do endométrio não foi efetuada devido ao reduzido número de amostras em cada categoria. A Figura 19 representa a média de células SP das diferentes porções do endométrio distribuídas de acordo com a categoria de fibrose.

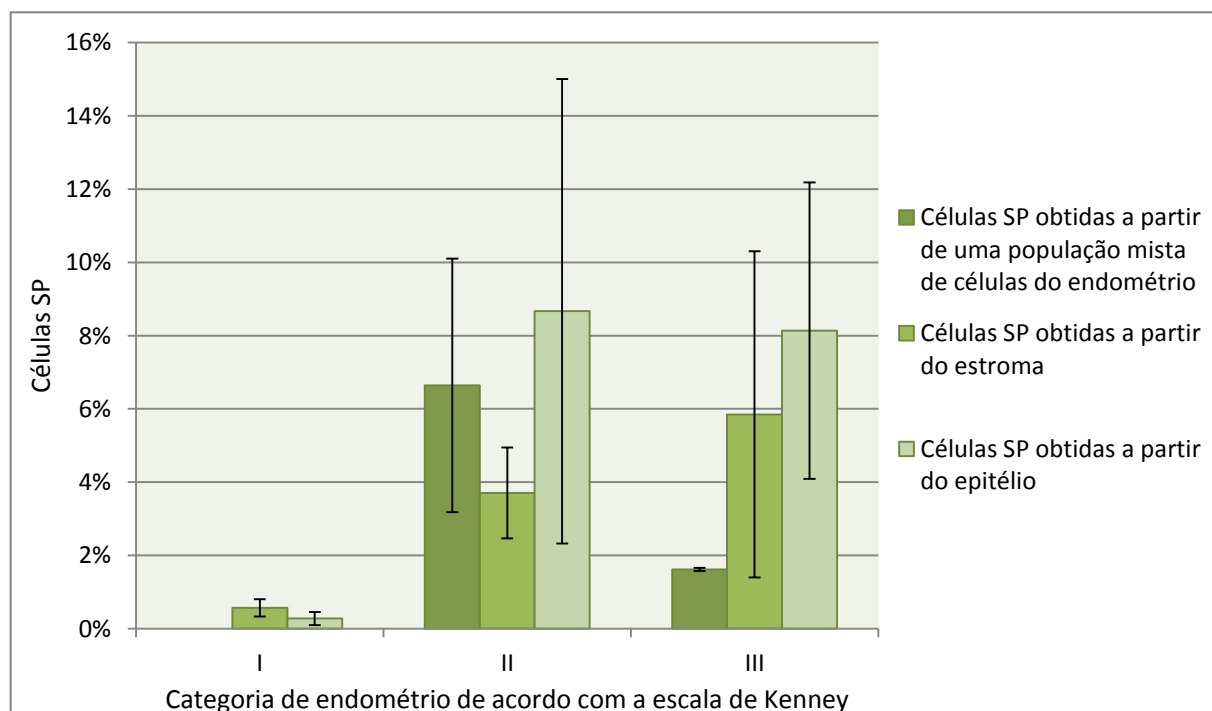


Figura 19 Proporção de células SP obtidas a partir de diferentes populações celulares do endométrio distribuídas de acordo com a categoria de fibrose (Kenney, 1978). As barras representam média  $\pm$  erro-padrão.

### 3.2.1. Efeito da criopreservação na detecção de células SP

---

A fração epitelial de uma das amostras foi corada com Hoechst logo após o isolamento e após criopreservação. Nesta amostra em particular, a proporção de células SP na amostra a fresco foi de 11,3%, enquanto que na amostra criopreservada foi de 13%. Os gráficos de cada uma das amostras estão representados na Figura 20:

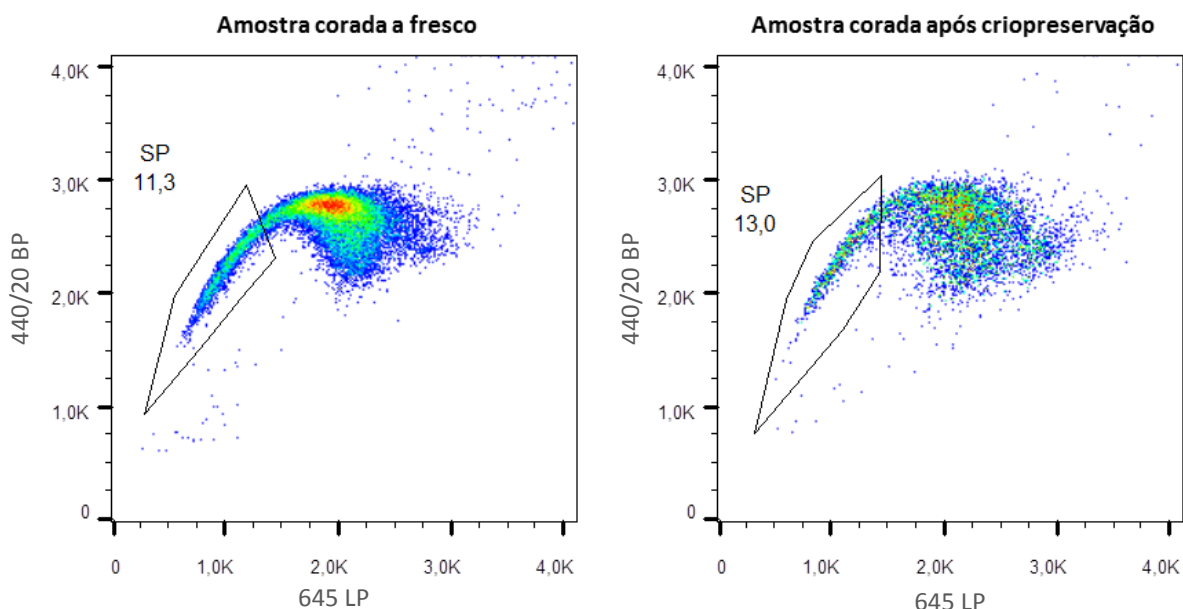


Figura 20 Perfil das células SP numa amostra de células obtidas do epitélio logo após o seu isolamento ou após criopreservação. O valor SP representa a percentagem de células no interior da região poligonal (seleção da população SP).

### 3.3. Cultura de células SP e NSP

---

Foi possível plaquear em triplicado todas as densidades (10, 20, 200 e >600 células/cm<sup>2</sup>) de cada amostra com células NSP. Para as células SP, a densidade máxima plaqueada variou entre 20 e >600 células/cm<sup>2</sup>, sendo limitada pelo número de células SP totais obtidas por citometria. Os diferentes tipos de culturas, as condições de cultura e a densidade mais elevada de células SP cultivada estão esquematizados na Tabela 9.



Tabela 9 Condições utilizadas para as diferentes culturas.

| Amostra | Fração cultivada   | Tamanho da placa | Nível de oxigénio | Densidade mais elevada de células SP (nº de pocilhos a essa densidade) | Tempo de cultura total (dias) |
|---------|--------------------|------------------|-------------------|--|-------------------------------|
| 19/2014 | Estroma            | 24 pocilhos      | Hipóxia           | 600 céls/cm <sup>2</sup> (um pocilho)                                  | 27                            |
| 23/2014 | Epitélio           | 24 pocilhos      | Hipóxia           | 20 céls/cm <sup>2</sup> (um pocilho)                                   | 20                            |
|         | Epitélio           |                  | Normóxia          | Apenas NSP cultivadas  | 20                            |
| 26/2014 | Estroma            | 24 pocilhos      | Hipóxia           | 200 céls/cm <sup>2</sup> (três pocilhos)                               | 20                            |
|         | Epitélio           |                  |                   | 200 céls/cm <sup>2</sup> (três pocilhos)                               | 20                            |
| 30/2014 | Estroma            | 24 pocilhos      | Hipóxia           | 200 céls/cm <sup>2</sup> (dois pocilhos)                               | 20                            |
|         | Epitélio           |                  |                   | 20 céls/cm <sup>2</sup> (três pocilhos)                                | 20                            |
| 34/2014 | Estroma            | 24 pocilhos      | Hipóxia           | 200 céls/cm <sup>2</sup> (um pocilho)                                  | 24                            |
|         | Epitélio           | 24 pocilhos      |                   | 200 céls/cm <sup>2</sup> (um pocilho)                                  | 24                            |
|         | Estroma + Epitélio | 6 pocilhos       |                   | Apenas NSP cultivadas  | 24                            |

O tempo total de cultura variou entre 20 e 27 dias, mas foi semelhante para as placas da mesma égua. No final do tempo de cultura não foi possível individualizar colónias com mais de 10 células (consideradas colónias de pequena dimensão). Durante esse tempo, as culturas foram monitorizadas entre quatro a cinco vezes com um intervalo de cinco a sete dias. Em todas as placas foram observados sinais microscópicos compatíveis com um grau variável de contaminação bacteriana (tendo resultado em alterações macroscópicas do meio e eliminação de vários pocilhos em certos casos). Estes sinais foram detetados após um período variável de tempo em cultura, oscilando entre os dois e os oito dias após o plaqueamento.

Num período inicial, as células apresentaram forma redonda e surgiram isoladas em baixos números, sendo mais fáceis de encontrar a partir da densidade de 200 cél/cm<sup>2</sup>. Os primeiros sinais de multiplicação foram detetados ao fim de um tempo variável; numa amostra, foram visíveis células em contacto 2 dias após o plaqueamento. No entanto, na maior parte das placas foram necessários 8 dias de cultura para esta observação, tanto em pocilhos SP como NSP. A partir de 200 cél/cm<sup>2</sup>, surgiram grupos de 4-5 células em contacto e, ocasionalmente, com mais células. Contudo, entre esse período e 10-12 dias após o plaqueamento, parece ter ocorrido uma perda de viabilidade, com a morte de algumas das células anteriormente em contacto, desaparecimento de alguns agrupamentos celulares e deterioração das características morfológicas das células presentes, cuja luminosidade

diminuiu e a membrana celular se tornou espessada. A Figura 21 mostra a evolução da população SP de um endométrio ao longo do período de cultura<sup>2</sup>.

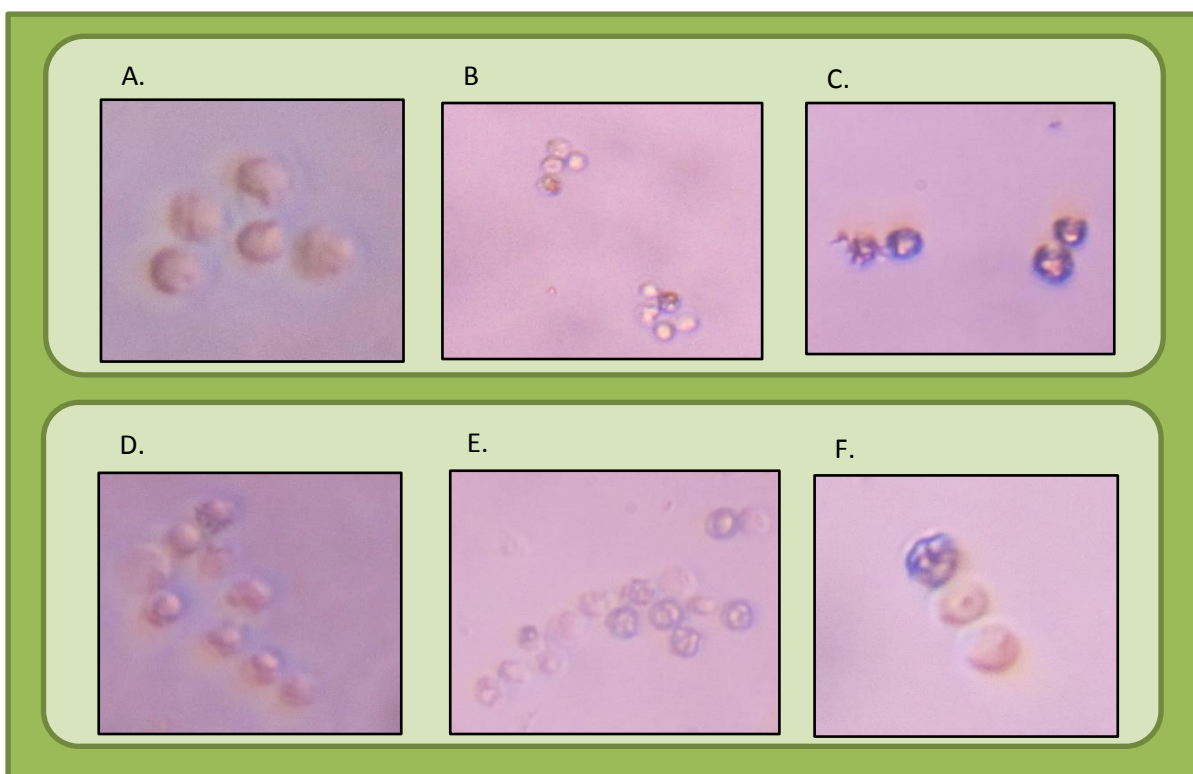


Figura 21 Evolução temporal da população SP obtida a partir do estroma e do epitélio de uma égua. Células cultivadas a uma densidade de 200 células/cm<sup>2</sup>. A, B e C representam células SP obtidas a partir do estroma observadas ao microscópio invertido 8, 13 e 20 dias após plaqueamento, respectivamente. D, E e F representam células SP isoladas do epitélio observadas 8, 13 e 20 dias após o plaqueamento, respectivamente. A partir de B e E é possível observar perda de qualidade morfológica das células em contacto, estando presentes em menor número em C e F.

Em sete das dez placas cultivadas surgiram células de aspeto fibroblastóide, que apresentavam núcleo de grandes dimensões, menor definição do contorno celular e forma inicialmente alongada ou com um aumento da quantidade de citoplasma relativamente ao núcleo, surgindo por vezes prolongamentos citoplasmáticos longos. Com o aumento da confluência, o núcleo tornou-se mais pequeno e as células adoptaram uma morfologia alongada, dispondo-se paralelamente. Estas células foram vistas tanto em pocilhos de células SP como nos de células NSP, obtidas tanto do estroma como do epitélio, tendo sido detetadas entre os 10 e os 17 dias após o plaqueamento. Em vários pocilhos, surgiu mais do que uma zona distinta com este tipo celular. A sua presença surgiu frequentemente em conjunto com células redondas de pequenas dimensões organizadas em colónias de poucos elementos, muitas vezes em aparente contacto com as células de aspecto fibroblastóide. Em zonas de menor confluência também se observaram células redondas e isoladas, de

<sup>2</sup> Todas as fotos de cultura de células doravante expostas foram captadas a uma ampliação de 20x, mas apresentam diferentes redimensionamentos e, portanto, diferentes proporções relativas.

maior tamanho que as células formando as colónias de pequenas dimensões junto às células fibroblastóides. Os dados relativos à presença das células de aspeto fibroblastóide nas culturas estão esquematizados na Tabela 10:

Tabela 10 Dados das culturas relativamente à presença de células de aspeto fibroblastóide. DPP indica “dias pós-plaqueamento”. Células a vermelho indicam amostras em que não se detetaram células de aspeto fibroblastóide. \* indica um caso em que se detetaram células fibroblastóides durante o período de cultura, mas não no final após fixação e coloração.

| Amostra | Fração uterina      | População celular | Precocidade da deteção (DPP) | Densidade de plaqueamento (final da cultura)                                 | Número de pocilhos |
|---------|---------------------|-------------------|------------------------------|--|--------------------|
| 19/2014 | Estroma             |                   |                              |  |                    |
| 23/2014 | Epitélio (hipóxia)  | NSP               | 14                           | 200 cél/cm <sup>2</sup>  | 1                  |
|         | Epitélio (normóxia) |                   |                              |  |                    |
| 26/2014 | Estroma             |                   |                              |  |                    |
|         | Epitélio            | NSP               | 13                           | 20 cél/cm <sup>2</sup>   | 1                  |
| 30/2014 | Estroma             | SP                | 7                            | 10 cél/cm <sup>2</sup><br>20 cél/cm <sup>2</sup>                             | 3                  |
|         |                     | NSP               |                              | 20 cél/cm <sup>2</sup><br>200 cél/cm <sup>2</sup><br>600 cél/cm <sup>2</sup> | 9                  |
|         | Epitélio            | SP                | 7                            | 20 cél/cm <sup>2</sup>   | 2                  |
|         |                     | NSP               |                              | 20 cél/cm <sup>2</sup><br>200 cél/cm <sup>2</sup><br>600 cél/cm <sup>2</sup> | 8                  |
|         | Estroma             | NSP               | 10                           | Não detetadas*   |                    |
|         | Epitélio            | NSP               | 10                           | 200 cél/cm <sup>2</sup><br>600 cél/cm <sup>2</sup>                           | 4                  |
| 34/2014 | Estroma+Epitélio    | NSP               | 17                           | Estroma:<br>10 cél/cm <sup>2</sup><br>200 cél/cm <sup>2</sup>                | 2                  |
|         |                     |                   |                              | Epitélio:<br>20 cél/cm <sup>2</sup><br>200 cél/cm <sup>2</sup>               | 3                  |

A análise destes dados revela que algumas amostras apresentaram células de aspeto fibroblastóide em praticamente todos os pocilhos com a mesma densidade celular, mas noutras amostras estas surgiram pontualmente em apenas um pocilho. Em apenas duas culturas foram detetadas em simultâneo nas populações SP e NSP. Nas restantes amostras, as células de aspeto fibroblastóide foram encontradas apenas na população NSP.

### 3.3.1. Cultura em hipóxia e em normóxia

---

As amostras cultivadas em hipóxia e normóxia foram monitorizadas a cada 3-7 dias, num total de cinco vezes ao longo do período de cultura de vinte dias. Enquanto que em normóxia as células aparentaram possuir melhor morfologia, surgiram maioritariamente isoladas ou aos pares. Em hipóxia surgiram sinais mais precoces de multiplicação, com células aos pares ou em pequenos grupos, mas com uma consequente deterioração da morfologia. No entanto, detetaram-se células fibroblastóides num pocilho cultivado em hipóxia, mas em nenhum dos pocilhos cultivados em normóxia (tratando-se da mesma população celular). Para além das células de aspeto fibroblastóide, foi possível visualizar pequenas colónias nas proximidades ou em contacto com as primeiras. Esta observação não ocorreu para as células cultivadas em normóxia (Figura 22).

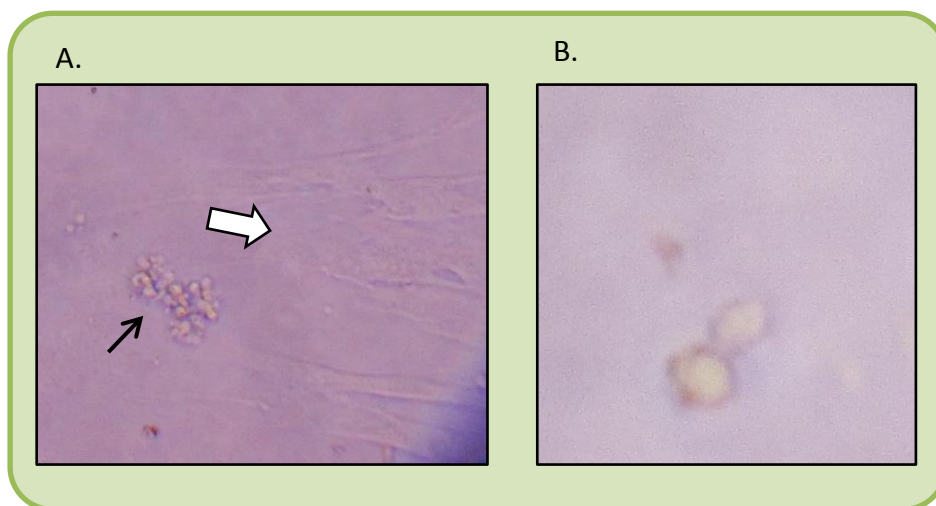


Figura 22 Observação microscópica da amostra de células NSP obtidas a partir do epitélio cultivada em hipóxia (A) ou normóxia (B), à densidade de 200 células/cm<sup>2</sup>, 20 dias após plaqueamento.

A. – Colónia de vários elementos celulares de forma redonda (seta escura), com a presença de células de aspeto fibroblastóide na proximidade (seta branca).

B. – Células redondas em contacto. Não existem células de aspeto fibroblastóide nem colónias com mais de 10 células redondas (colónias de pequena dimensão).

### 3.3.2. Cultura em placa de 6 pocilhos e de 24 pocilhos

---

A cultura de estroma em 24 pocilhos sofreu um grau de contaminação bacteriana elevado, tendo-se eliminado todos os pocilhos à exceção de dois. Nestes pocilhos foram detetadas células de aspeto fibroblastóide, as quais desapareceram durante monitorizações subsequentes. As células de aspeto fibroblastóide estavam também presentes em vários pocilhos da amostra de células isoladas do epitélio cultivada em 24 pocilhos, com algumas células redondas em contacto direto com as primeiras. Adicionalmente, surgiu um outro tipo

celular representado por células poligonais, que formaram um tapete de confluência variável em mais do que um dos pocilhos (Figura 23).

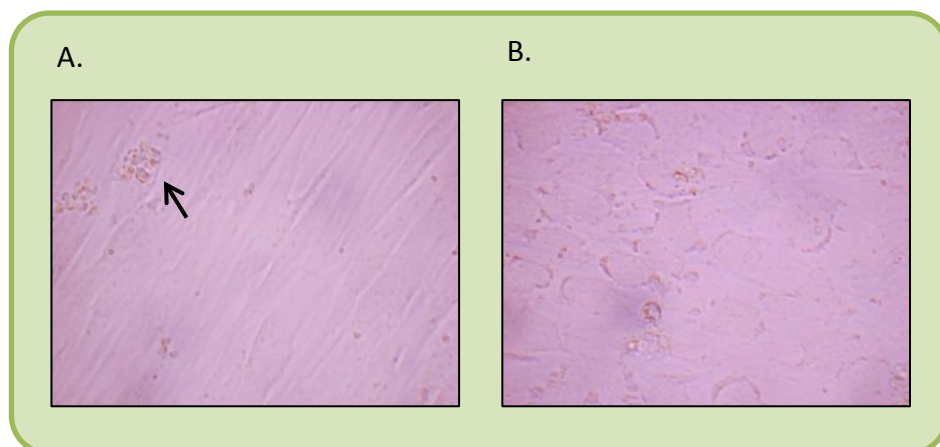


Figura 23 Observação microscópica dos diferentes tipos celulares encontrados na cultura de células NSP obtidas a partir do endométrio (placa de 24 pocilhos), cultivadas a uma densidade de 200 células/cm<sup>2</sup>, 24 dias após o plaqueamento.

A. – Células de aspeto fibroblatoide, com algumas células redondas parcialmente aderidas (seta escura).

B. – Células de morfologia poligonal em confluência.

As células obtidas do estroma do endométrio que foram cultivadas na placa de 6 pocilhos consistiram em células de aspeto redondo, formando pequenos grupos, bem como células de aspeto fibroblastóide frequentemente distribuídas em zonas distantes do pocilho. Um dos pocilhos apresentou poucas células durante o período de cultura. Na população recolhida a partir do epitélio, as células apresentaram comportamento semelhante, tendo, no entanto, surgido células fibroblastóides em todos os pocilhos. Estas colónias de células fibroblastóides foram as únicas macroscopicamente individualizáveis após a coloração com azul de toluidina (Figura 24).

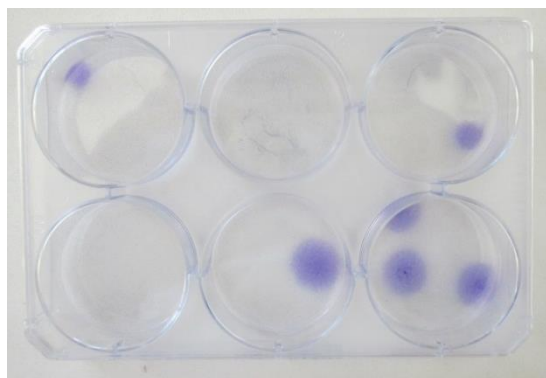


Figura 24 Placa de 6 pocilhos após coloração com azul de toluidina. Amostra de células obtidas a partir do estroma (primeira linha) ou do epitélio (segunda linha) cultivadas a 10, 20 e 200 células/cm<sup>2</sup>. Foram identificáveis macroscopicamente colónias individualizadas que corresponderam microscopicamente a células de aspeto fibroblastóide.

#### 4. Discussão

---

Ao contrário de vários estudos realizados no endométrio, todas as células deste trabalho foram obtidas *post-mortem*, embora o tempo até ao seu isolamento fosse minimizado o mais possível. Estudos feitos em cão e em cavalo com MSCs indicaram que não há alterações significativas na capacidade de aderência, potencial proliferativo ou resultados de imunofenotipagem quando a colheita dos tecidos é feita *post-mortem* (Radtke, Nino-Fong, Esparza Gonzalez, Stryhn, & McDuffee, 2013), tendo-se chegado a conclusões semelhantes com células obtidas por histerectomia (Dimitrov *et al.*, 2008; Gargett, Schwab, Zillwood, Nguyen, & Wu, 2009; Kato *et al.*, 2007).

A base do protocolo de isolamento celular utilizado foi semelhante em todas as amostras, tendo sido feitas algumas modificações no processamento de algumas amostras. No entanto, não existiram diferenças significativas no número de células obtidas tendo em conta o volume de tecido processado, indicando que estas alterações não levam a perda de células devidas à técnica. Foi possível isolar células do estroma e do epitélio do endométrio em todas as éguas em que o protocolo de Cervelló *et al.* (2014) foi aplicado. Na fase lútea, o número de células obtido foi menor no epitélio, o que pode ser justificado pelo facto de nesta fase existir um período de atrofia endometrial, enquanto que a fase folicular é uma fase proliferativa (Kenney, 1978). No entanto, durante a fase folicular, as células obtidas do epitélio apresentam menor viabilidade que as do estroma. Este resultado pode estar relacionado com um tempo de processamento experimental mais longo, o que é suportado pela observação de que as células do epitélio apresentaram em todas as amostras valores de viabilidade inferiores às do estroma. Por outro lado, a análise de acordo com a fase do ciclo éstrico baseou-se na divisão em fase folicular e fase lútea, não fazendo distinção entre os diferentes períodos da fase lútea. Assim sendo, foram incluídas na fase lútea amostras de endométrio obtidas no início, no meio e no fim dessa fase. A equipa de Cervelló *et al.* (2010), utilizando um protocolo de isolamento celular semelhante em endométrio de mulher, reporta viabilidades celulares entre 60 e 85%. Um protocolo diferente de isolamento de células endometriais na égua refere uma viabilidade superior a 95% para o estroma, semelhante ao observado para o estroma da mulher (Periwall, Bhargava, Farooq, Bhatla, & Murugesan, 1995; Watson, Aubrey, Zanecosky, & Sertich, 1992). Outra descrição em tecido humano refere valores de 80-95% para as células do estroma (Bläuer, Heinonen, Martikainen, Tomás, & Ylikomi, 2005). Na vaca, os valores de viabilidade para as células do epitélio variam com diferentes técnicas, estando descritos valores de 87-92% (Thibodeaux, Roussel, Menezo, Godke, & Goodeaux, 1991) ou 95% (Fortier, Guilbault, & Grasso, 1988). Na porca estão descritos valores de 94% de viabilidade para células do estroma e 88% para epitélio luminal (Zhang, Paria, & Davis, 1991). Na maioria das amostras avaliadas, o protocolo utilizado para este trabalho não permitiu obter viabilidades tão elevadas.

De acordo com a informação disponível, a presença de uma população SP no útero da égua foi demonstrada pela primeira vez neste trabalho. Esta população foi encontrada em populações mistas de células do endométrio, na fração epitelial e no estroma, como descrito para a mulher (Cervelló *et al.*, 2010). De referir que as duas frações uterinas obtidas com o protocolo de isolamento deste trabalho são frações de células com proveniência predominante do estroma ou do epitélio e o seu grau de pureza não foi avaliado, ao contrário do estudo anteriormente referido.

A população SP do estroma da égua variou entre 0,57 e 10,3%, sendo em média  $3,90 \pm 1,50\%$ , enquanto que no epitélio variou entre 0,11 e 15% (média:  $7,03 \pm 2,77\%$ ); nas amostras de endométrio total a variação foi de 0,10% a 5,1% (média:  $2,78 \pm 1,16$ ). Estes valores são mais elevados do que os reportados em outros estudos com populações SP do endométrio. Na mulher, por histerectomia, os valores de células SP variaram entre 0,01 e 3% (Kato *et al.*, 2007), enquanto que usando biópsia uterina, as células SP do epitélio corresponderam a  $1,68 \pm 0,27\%$  e as do estroma a  $0,39 \pm 0,06\%$  (Cervelló *et al.*, 2011). Outra equipa reportou valores de  $2,741 \pm 0,443\%$  de células SP na fração enriquecida em células epiteliais e  $3,091 \pm 0,439\%$  na fração enriquecida em células do estroma do endométrio humano (Masuda *et al.*, 2010). Em linhas celulares de cancro endometrial de murganho e humano a proporção de células SP foi de  $0,63 \pm 0,55\%$  e  $0,20 \pm 0,09\%$ , respectivamente. Na égua, não foram encontradas descrições na literatura para os valores de células SP ou outro tipo de células de características estaminais no útero. É importante referir em relação aos valores de células SP no útero da égua que estes correspondem a medições feitas na fração analisada e não por diferença com a amostra emparelhada com verapamil, um dado frequentemente em falta nos estudos efetuados com estas células; se se usar esta estratégia, os valores de células SP calculados diminuem. No entanto, o verapamil não é um inibidor específico do transportador responsável pelo efluxo do Hoechst (Scharenberg, 2002). Assim sendo, as células SP podem ser visíveis na presença de verapamil, pelo que esta abordagem pode subavaliar a proporção de células SP. A concentração de verapamil otimizada foi semelhante à concentração usada por outras equipas em células SP de endométrio humano (Cervelló *et al.*, 2010; Cervelló *et al.*, 2011; Kato *et al.*, 2007), permitindo a visualização da população SP com a melhor viabilidade possível. Estas diferenças podem ainda ser devidas a abordagens diferentes na definição das diferentes janelas durante a citometria, já que várias equipas selecionam uma primeira janela de células por avaliação dos eventos nas duas frequências de emissão do Hoechst, enquanto que outros autores adotam estratégias semelhantes à usada neste trabalho, aplicando janelas adicionais antes de avaliar as populações SP e NSP (Mathew *et al.*, 2009; Meeson, Fuller, Breault, Owens, & Richardson, 2013). Por outro lado, o número de células avaliadas em cada amostra variou e, assim, cada proporção de células SP é relativa a um

número determinado de células total que é variável de amostra para amostra, principalmente devido a variações na viabilidade. Por fim, os elevados valores de células SP no útero da égua podem ser uma característica específica desta espécie, com uma maior proporção destas células sem características estaminais e, portanto, mais heterogénea. Uma vez que as células obtidas não foram suficientemente caracterizadas em relação a estas propriedades até ao momento deste trabalho, esta hipótese não foi estudada e não existem resultados neste sentido.

Os resultados obtidos indicam que as células SP estão presentes em maior proporção na fase folicular, e, dentro dessa fase, na fração epitelial. Esta observação poderá estar relacionada com o facto de a fase folicular do ciclo éstrico ser uma fase proliferativa do endométrio, nomeadamente para o epitélio, o que levanta a hipótese de a população SP poder contribuir para este processo. Durante a fase folicular há uma maior proliferação de células no epitélio e também no estrato compacto (Ferreira-Dias, Serrão, Durão, & Silva, 2001; Gerstenberg, Allen, & Stewart, 1999). Na mulher, a população SP do endométrio existe em maior número na fase proliferativa e menstrual (Kato *et al.*, 2007; Masuda *et al.*, 2010) e na fração epitelial (Cervelló *et al.*, 2010), resultados concordantes com os deste trabalho. Uma explicação alternativa estaria relacionada com o facto de a proporção de células SP no epitélio ser superior por este possuir menos viabilidade, levando à análise de um menor número de células totais.

Não foi possível analisar a relação entre a proporção de células SP isoladas a partir das diferentes porções do endométrio e o grau de fibrose deste. O número de amostras foi reduzido e estas não estavam igualmente distribuídas pelos três graus de fibrose. É de salientar que houve apenas uma égua com a classificação mais baixa (endométrio sem alterações) avaliada para pesquisa de células SP. Apesar de não ser claro qual o possível papel de células endometriais com propriedades estaminais na patologia da endometrose, já foi demonstrado que a administração intra-uterina de MSCs equinas é possível e pode originar uma remodelação do tecido endometrial que diminui a progressão dos focos fibróticos, o que revela a importância do estudo do potencial das células estaminais e da patogénese da endometrose (Mambelli *et al.*, 2013; Mambelli *et al.*, 2014).

A maior parte das amostras permitiu identificar com facilidade a população SP. No entanto, não foi possível identificar um padrão de coloração normal numa das amostras de epitélio. Além disso, duas frações de células endometriais de uma égua (epiteliais ou do estroma), apresentaram uma inversão da proporção entre células SP com e sem verapamil (havendo mais células SP na presença de verapamil do que na sua ausência). O primeiro caso pode ser atribuído a uma de duas situações: um erro laboratorial em que a concentração de Hoechst adicionada foi inferior à concentração otimizada, ou uma insaturação do meio com



Hoechst devido à presença excessiva de detritos celulares (visíveis em grande quantidade no passo de contagem celular em câmara de Neubauer). O perfil celular com verapamil foi normal, enquanto que na ausência de verapamil não houve definição de uma população principal. De acordo com um estudo efetuado ao longo da incubação do Hoechst, este perfil pode ser compatível com o início da incubação, em que a população está a acumular o corante e a passar pela região da população SP mas ainda não acumulou quantidade suficiente para definir a população principal, como ilustrado na Figura 25 (Ibrahim, Diercks, Petersen, & van den Engh, 2007). Dado que o tempo de incubação foi suficiente para obter na amostra emparelhada um perfil normal, a alteração na concentração de Hoechst é provavelmente a responsável pelo perfil anormal.

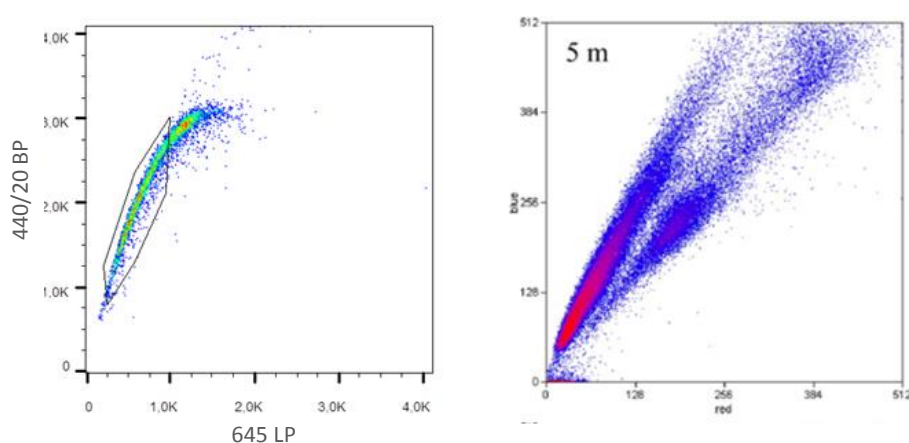


Figura 25 Padrão anormal das células obtidas a partir do epitélio (esquerda) comparado com o padrão de coloração Hoechst após cinco minutos de incubação (direita, adaptado de Ibrahim *et al.*, 2007).

Apesar disto, a análise das células SP de uma linha celular com aumento da expressão de MDR1 ou da linha neoplásica A549 permite observar um padrão semelhante (Benchouir *et al.*, 2004; Scharenberg, 2002). No entanto, dada a ausência de uma população principal e o perfil normal na presença de verapamil da mesma amostra, este resultado é mais compatível com uma falha na incubação com o Hoechst.

No segundo caso, em que a população SP surgiu em maior proporção na presença de verapamil do que na sua ausência (ilustrado anteriormente na Figura 17, página 51), pode ter existido um erro de identificação e troca das amostras. Por outro lado, ocorreu uma grande mortalidade celular nas duas amostras e poucos eventos foram analisados, podendo contribuir para uma má interpretação dos resultados. Devido ao reduzido número de eventos, não foi possível definir um “gate” para a colheita de um número significativo de células SP de uma das frações, pelo que não se realizou o seu isolamento.

Em nenhuma das amostras analisadas neste trabalho o verapamil eliminou por completo a população SP (o valor mais baixo de células SP na presença de verapamil foi de 0,09%). Como em outros estudos, a utilização de verapamil não elimina por completo a população SP, indicando que as bombas MDR1 não são as únicas responsáveis pela extrusão do corante (Scharenberg, 2002). A criopreservação também não pareceu influenciar a capacidade de obtenção de um perfil SP, tendo contudo repercussões principalmente a nível de viabilidade celular. Na amostra que foi corada diretamente após isolamento ou após criopreservação, a proporção de células SP foi superior nas células criopreservadas do que nas células analisada a fresco (Figura 20, página 53). Esta maior proporção pode ser devida à maior viabilidade das células SP comparativamente às células NSP ou ser um artefacto por se terem avaliado menos células. Não foram encontrados estudos relativos a populações SP estudadas após criopreservação.

Foi usado o fenótipo SP para obter uma população rica em células com potenciais características estaminais para cultura a densidades celulares definidas. Visto ter-se revestido os pocilhos com gelatina, não foi possível caracterizar as células relativamente à sua capacidade de aderência ao plástico. Um estudo com MSCs do cordão umbilical de equino indica que estas têm melhores tempos de duplicação de população quando cultivadas numa matriz (gelatina, colagénio ou fibrinonectina) do que em superfícies sem revestimento (Reed & Johnson, 2012). Por outro lado, há autores que referem que utilizar gelatina permite manter uma boa cultura a longo prazo de células endometriais epiteliais, mais difíceis de cultivar que as células do estroma (Zhang, Rees, & Bicknell, 1995). Assim, a opção de usar gelatina favorece uma melhor manutenção tanto de uma possível população de MSCs em cultura, como de células epiteliais. No entanto, dificulta a comparação dos resultados com outros estudos em que não se fez revestimento do plástico. Apesar desta limitação, um estudo de potenciais MSCs uterinas da mulher foi efetuado em placas revestidas com fibronectina para avaliação do seu potencial clonogénico, obtendo-se CFU tanto nas células colhidas do estroma como do epitélio (Gargett *et al.*, 2009). Adicionalmente, em outro estudo de caracterização de células SP e NSP de endométrio humano foram utilizadas placas revestidas com colagénio numa fase inicial de cultura das populações celulares (Kato *et al.*, 2007). Para além desta abordagem, no mesmo estudo as células SP e NSP foram cultivadas em *feeder layers* e em Matrigel™ (extrato de membrana basal). Assim, existem vários estudos, inclusive com células endometriais, com diferentes condições de crescimento em cultura.

Quando cultivadas a densidades celulares definidas, as células de características estaminais do endométrio têm capacidade formadora de colónias. Nesta situação, quando cultivadas em fibronectina (sem sofrer qualquer processo prévio de purificação ou enriquecimento para células estaminais), as células do estroma e do epitélio do endométrio

humano demonstraram iniciar a sua proliferação 3-4 dias após o plaqueamento, formaram pequenos agregados celulares ao fim de 6-8 dias, originaram colónias de grandes dimensões e de pequenas dimensões ao fim de 15 dias e, a partir dos dias 10-12, o crescimento das colónias de grandes dimensões acelerou (Li, He, Liu, Wang, & Pu, 2014). Ainda que grande parte das células cultivadas tenha aparentado proliferar poucos dias após o plaqueamento, o surgimento de agregados uma semana após crescimento foi variável e não chegaram a surgir colónias de pequenas ou grandes dimensões, mesmo com um tempo de cultura máximo de 27 dias. Tanto as células SP como as células NSP aparentaram ter capacidade replicativa, formando colónias de alguns elementos após um tempo variável em cultura, mas não foi possível observar colónias com mais de dez elementos (consideradas colónias de pequena dimensão) no final do tempo de cultura. Por outro lado, as células cultivadas apresentaram morfologia redonda, fibroblastóide e, num caso, poligonal; as células epiteliais estudadas por Li *et al.* (2014) originaram colónias com células redondas no centro e células de morfologia epitelial na periferia, enquanto que as colónias de estroma eram constituídas por colónias espiraladas e densas no centro. A não formação de colónias das células isoladas da égua pode ter ocorrido devido a várias causas: as condições de cultura não estavam otimizadas para as populações em estudo; existiu perda de células durante as trocas de meio de cultura e a coloração com azul de toluidina; ou as células em estudo não apresentam capacidade formadora de colónias.

Visto não existirem estudos em células SP equinos sobre as condições de cultura ideais, foram adaptadas de protocolos em células SP humanas. Provavelmente, não estão otimizadas em relação aos constituintes do meio de cultura e de tensão de oxigénio para o crescimento de células equinas. Por outro lado, as células estudadas neste trabalho apresentaram crescimento lento, o que pode ser devido ao facto de a maior parte das células SP se encontrar na fase G0 do ciclo celular (estadio quiescente). Este valor pode chegar a 85% (Gargett & Masuda, 2010). No entanto, as células NSP não aparentaram sofrer um crescimento mais rápido que as células SP nas fases iniciais da cultura. Uma vez mais, as condições de cultura podem ter sido responsáveis por esta observação. Existe ainda a possibilidade de o Hoechst, usado para identificar a população SP e NSP, ter tido um efeito negativo no potencial de proliferação das populações celulares, dado que é um corante que se integra no DNA (Hahnagy, Gaboury, Beaulieu, & Balicki, 2006). No entanto, a presença de um grau variável de contaminação bacteriana em praticamente todas as placas pode ser o principal responsável pelo aparente crescimento lento das culturas. A presença de bactérias em cultura é responsável pela alteração da constituição do meio, como pode ser visível pela alteração do pH, mas os produtos do seu metabolismo também podem levar à diminuição do crescimento celular, alterações morfológicas na célula e, em células epiteliais ciliadas, diminuir a atividade dos cílios (Bajolet-Laudinat *et al.*, 1994). Graus

baixos de contaminação bacteriana (100-1000 bactérias por mL de meio) podem passar despercebidos à observação macro e microscópica, embora não aparentem exercer efeito citopático nas células (Fogh, Holmgren, & Ludovici, 1950). Os mesmos motivos que podem ter condicionado a formação de colónias podem ser responsáveis pela aparente perda de viabilidade a partir dos 10-12 dias em cultura, nomeadamente a inadequação das condições de cultura às populações celulares em termos de meio utilizado, tensão de oxigénio e grau de contaminação microbiana.

Verificou-se que algumas células alteraram a sua morfologia para células de aspeto fibroblastóide, preenchendo o fundo do pocilho na quase totalidade ao fim do período de cultura. No entanto, não surgiram em todas as culturas celulares nem em todos os pocilhos da mesma amostra plaqueados à mesma densidade celular. Adicionalmente, surgiram também em culturas de células isoladas do epitélio do endométrio, facto muito provavelmente relacionado com a presença de uma porção de células do estroma na fração enriquecida em células epiteliais.

Em cultura sobre plástico, as células do estroma e do epitélio do endométrio equino apresentam morfologia distinta. As células do estroma adoptam forma fusiforme e fibroblástica, tal como as células detetadas em alguns pocilhos deste trabalho, alcançando confluência rapidamente. As células epiteliais assumem forma poliédrica e, ocasionalmente, alongada (Watson *et al.*, 1992). Esta morfologia acontece também no tecido endometrial humano mesmo a densidades clonais (Li *et al.*, 2014). De maneira similar, linhas celulares epiteliais obtidas a partir de células SP do útero da mulher adoptam forma arredonda, enquanto que células do estroma originam células de aspeto fibroblastóide (Cervelló *et al.*, 2011).

Nas culturas celulares deste trabalho, o aparecimento mais precoce de células fibroblastóides ocorreu aos 10 dias e apenas em um pocilho de células isoladas do epitélio surgiram células com morfologia compatível com células epiteliais. Em 7 das 10 placas cultivadas houve surgimento de células de aspeto fibroblastóide em pelo menos um pocilho, mas com aparecimento tão tardio como 17 dias após o início da cultura. Este tipo celular foi observado simultaneamente nas populações SP e NSP de apenas duas placas, surgindo nas NSP das restantes cinco, mas tal pode ser simplesmente devido ao facto de se terem cultivado mais pocilhos de células NSP do que SP (64% dos pocilhos foram cultivados com células NSP e 36% com células SP). Estes resultados podem sugerir, uma vez mais, uma inadequação das condições de cultura relativamente às células cultivadas. Vários estudos utilizam meios de cultura semelhantes, com DMEM/F12 e FBS, glutamina e antibióticos, sem adição de outros componentes (Cervelló *et al.*, 2010; Cervelló *et al.*, 2011; Dimitrov *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2014). Neste trabalho optou-se pela utilização de meio  $\alpha$ -MEM em vez de

DMEM/F12 para cultura de células SP com base num estudo que indica que o primeiro favorece um melhor crescimento e manutenção de MSCs humanas do que o segundo (Sotiropoulou, Perez, Salagianni, Baxevanis, & Papamichail, 2006). Um outro estudo indica que as células SP não apresentaram bom crescimento sem adição de fatores de crescimento e hormonas, embora tenha utilizado um meio de cultura diferente (Masuda *et al.*, 2010). Apesar desta diferença, este mesmo estudo refere uma observação concordante com os resultados deste trabalho: na presença de células com morfologia fibroblastóide, a manutenção de colónias parece ser favorecida, surgindo, com frequência, com mais células do que na ausência das células fibroblastóides. Assim, a interação entre células SP e NSP pode ser benéfica na manutenção das primeiras, como sugerido por Masuda *et al.* (2010).

A hipóxia demonstrou ser um fator importante na manutenção do estadio indiferenciado de várias populações estaminais e precursoras estudadas em diferentes espécies e tecidos (Mohyeldin, Garzón-Muvdi, & Quiñones-Hinojosa, 2010). Também existem dados na mulher que indicam que as células SP do endométrio crescem melhor em ambiente de hipóxia (Cervelló *et al.*, 2010), mas este fator é desconhecido para o caso da égua. Assim, investigou-se a hipótese de a atmosfera de hipóxia poder condicionar o potencial proliferativo das populações SP e NSP do endométrio da égua. Esta hipótese foi estudada numa amostra de epitélio. O surgimento de células de aspeto fibroblastóide ocorreu em apenas um pocilho em atmosfera de hipóxia e nenhum em normóxia. Em hipóxia surgiu um maior número de células em grupo, mas com menos qualidade morfológica do que em normóxia. Estes resultados referem-se apenas a células NSP, já que foram as únicas plaqueadas em hipóxia e em normóxia. A hipótese apresentada é que o aparecimento de células fibroblastóides possa estar relacionado com o nível de oxigénio. Contudo a sua confirmação requer um maior número de amostras com inclusão de células SP, uma vez que também está reportado que a população SP não prolifera com facilidade em condições de hipóxia (Masuda *et al.*, 2010).

Outro fator cuja influência se tentou avaliar na capacidade de formação de colónias das células SP e NSP do endométrio da égua foi a área disponível para o crescimento celular. Em vários estudos com células potencialmente estaminais, os ensaios de clonogenicidade foram efetuados em placas de 6 pocilhos (Cervelló *et al.*, 2010; Cervelló *et al.*, 2011; Dimitrov *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2014). Apesar de se utilizarem densidades clonogénicas neste trabalho, foram usadas inicialmente placas de 24 pocilhos, com uma menor área do que as placas de 6 pocilhos. Para tentar diminuir as variantes relativamente aos outros estudos, realizou-se cultura de uma amostra de estroma e de epitélio em placa de 24 pocilhos e em placa de 6 pocilhos. Para se obter a mesma densidade celular nas placas de 6 e de 24 pocilhos, é necessário colocar mais células num pocilho da primeira placa do que num pocilho da segunda; este facto, por si só, poderá eventualmente ser suficiente para melhorar

as características das células em cultura por permitir que mais células se mantenham viáveis em condições potencialmente não otimizadas. Por outro lado, a utilização de placas de 6 pocilhos, com uma maior área, permitiu a visualização macroscópica de colónias após a coloração com azul de toluidina, enquanto que em várias placas de 24 pocilhos com células de aspeto fibroblastóide em confluência tornou-se difícil individualizar diferentes colónias que, mesmo com origem em sítios distintos do pocilho, se fundiam.

## **5. Conclusão**

---

A coloração Hoechst é um método de abordagem simples para o possível enriquecimento de SSCs, mas necessita de um citómetro corretamente equipado e de um processo de otimização para o tecido a ser estudado. Trata-se ainda de um ensaio funcional e, portanto, dependente da viabilidade das amostras. Não pode, igualmente, ser utilizado como marcador único de células estaminais, sendo necessários estudos posteriores nas populações isoladas para avaliar essas características.

A presença de células com o fenótipo SP no endométrio da égua foi demonstrada pela primeira vez nos endométrios de todas as éguas analisadas. A proporção de células com este fenótipo foi superior aos valores reportados noutros estudos em outras espécies animais, sugerindo que estas células podem ser mais resistentes ao processamento ou que esta pode ser uma característica da espécie. A proporção de células SP foi também superior na fase folicular e no epitélio durante essa fase, sugerindo uma eventual relação com a proliferação do endométrio. Nas amostras analisadas neste trabalho não foi possível analisar uma possível relação entre os níveis de células SP e os diferentes graus de fibrose.

Não foi possível demonstrar a capacidade formadora de colónias das células estudadas, que pode ter sido inibida por vários fatores, nomeadamente utilização de técnicas de cultura subótimas e a presença de contaminação bacteriana. Os resultados relativos à utilização de hipóxia ou normóxia são inconclusivos, mas podem sugerir que as condições de hipóxia possivelmente tenham alguma relação com a capacidade proliferativa das células cultivadas. A utilização de placas de 6 pocilhos pode apresentar vantagem em relação às de 24 pocilhos na individualização macroscópica de colónias.

Mais estudos são necessários para apurar as características das células SP do endométrio da égua, nomeadamente otimizar as condições de cultura, verificar a sua capacidade formadora de colónias, a capacidade de diferenciação, a avaliação de marcadores de superfície e a eventual produção de citocinas e receptores de hormonas esteróides. O estudo de um maior número de amostras com maior variação nos graus de endometrose

pode também permitir descobrir novas relações entre este processo patológico e as células SP e originar novas linhas de investigação relacionadas com a sua aplicação terapêutica.

## 6. Bibliografia

---

Addla, S. K., Brown, M. D., Hart, C. A., Ramani, V. A. C., & Clarke, N. W. (2008). Characterization of the Hoechst 33342 side population from normal and malignant human renal epithelial cells. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 295(3), F680–7.

Alcaraz, I. C., Gil-Sanchis, C., Perucho, A. M., & Valles, C. S. (2009). Current understanding of endometrial stem cells. *Expert Review of Obstetrics & Gynecology*, 4(3), 273–282.

Alison, M. R. (2003). Tissue-based stem cells: ABC transporter proteins take centre stage. *The Journal of Pathology*, 200(5), 547–50.

Alt, E. U., Senst, C., Murthy, S. N., Slakey, D. P., Dupin, C. L., Chaffin, A. E., Kadowitz, P. J., & Izadpanah, R. (2012). Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties. *Stem Cell Research*, 8(2), 215–25.

Alvarez-Barrientos, A., Arroyo, J., Cantón, R., Nombela, C., & Sánchez-Pérez, M. (2000). Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(2), 167–95.

Aresu, L., Benali, S., Giannuzzi, D., Mantovani, R., Castagnaro, M., & Falomo, M. E. (2012). The role of inflammation and matrix metalloproteinases in equine endometriosis. *Journal of Veterinary Science*, 13(2), 171.

Asakura, A., & Rudnicki, M. a. (2002). Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation. *Experimental Hematology*, 30(11), 1339–45.

Azizi, S. A., Stokes, D., Augelli, B. J., DiGirolamo, C., & Prockop, D. J. (1998). Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(7), 3908–13.

Bajolet-Laudinat, O., Girod-de Bentzmann, S., Tournier, J. M., Madoulet, C., Plotkowski, M. C., Chippaux, C., & Puchelle, E. (1994). Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* internal lectin PA-I to respiratory epithelial cells in primary culture. *Infection and Immunity*, 62(10), 4481–7.



Barberini, D. J., Freitas, N. P., Magnoni, M. S., Maia, L., Listoni, A. J., Heckler, M. C., Sudano, M. J., Golim, M. A., Landim-Alvarenga, F. D., & Amorim, R. M. (2014). Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(1), 25.

Belloc, F., Dumain, P., Boisseau, M. R., Jalloustre, C., Reiffers, J., Bernard, P., & Lacombe, F. (1994). A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry*, 17(1), 59–65.

Ben Azouna, N., Jenhani, F., Regaya, Z., Berraeis, L., Ben Othman, T., Ducrocq, E., & Domenech, J. (2012). Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow: comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum. *Stem Cell Research & Therapy*, 3(1), 6.

Benchouir, R., Rameau, P., Decraene, C., Dreyfus, P., Israeli, D., Piétu, G., Danos, O., & Garcia, L. (2004). Evidence for a resident subset of cells with SP phenotype in the C2C12 myogenic line: a tool to explore muscle stem cell biology. *Experimental Cell Research*, 294(1), 254–68.

Bianco, P., Robey, P. G., & Simmons, P. J. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, 2(4), 313–9.

Bläuer, M., Heinonen, P. K., Martikainen, P. M., Tomás, E., & Ylikomi, T. (2005). A novel organotypic culture model for normal human endometrium: regulation of epithelial cell proliferation by estradiol and medroxyprogesterone acetate. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 20(4), 864–71.

Bongso, A., & Lee, E. H. (2005). Stem Cells : Their Definition , Classification and Sources. In A. Bongso & E. H. Lee (Eds.), *Stem Cells - From bench to bedside* (pp. 1–13).

Braun, J., Hack, A., Weis-Klemm, M., Conrad, S., Tremel, S., Kohler, K., Walliser, U., Skutella, T., & Aicher, W. K. (2010). Evaluation of the osteogenic and chondrogenic differentiation capacities of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *American Journal of Veterinary Research*, 71(10), 1228–36.

Brown, M. D., Gilmore, P. E., Hart, C. A., Samuel, J. D., Ramani, V. A. C., George, N. J., & Clarke, N. W. (2007). Characterization of benign and malignant prostate epithelial Hoechst 33342 side populations. *The Prostate*, 67(13), 1384–96.

Bunting, K. D. (2002). ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells* (Dayton, Ohio), 20(1), 11–20.

Burk, J., Ribitsch, I., Gittel, C., Juelke, H., Kasper, C., Staszyk, C., & Brehm, W. (2013). Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. *Veterinary Journal* (London, England : 1997), 195(1), 98–106.

Can, A. (2008). A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turkish Journal of Hematology*, 25, 57–59.

Caplan, A. I. (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), 341–7.

Caplan, A. I., & Bruder, S. P. (2001). Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in Molecular Medicine*, 7(6), 259–64.

Carvalho, A. de M., Alves, A. L. G., Golim, M. A., Moroz, A., Hussni, C. A., de Oliveira, P. G. G., & Deffune, E. (2009). Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 132(2-4), 303–6.

Cervelló, I., Gil, C., Faus, A., Simón, S. (2014) SOP: Separation of human endometrial epithelial and stromal cells. Side Population method. Fundación IVI, Universitat de Valencia.

Cervelló, I., Gil-Sanchis, C., Mas, A., Delgado-Rosas, F., Martínez-Conejero, J. A., Galán, A., Martínez-Romero, A., Martínez, S., Navarro, I., Ferro, J., Horcajadas, J. A., Esteban, F. J., O'Connor, J. E., Pellicer, A., & Simón, C. (2010). Human endometrial side population cells exhibit genotypic, phenotypic and functional features of somatic stem cells. *PLoS One*, 5(6), e10964.

Cervelló, I., Gil-Sanchis, C., Mas, A., Faus, A., Sanz, J., Moscardó, F., Higuera, G., Sanz, M. A., Pellicer, A., & Simón, C. (2012). Bone marrow-derived cells from male donors do not contribute to the endometrial side population of the recipient. *PLoS One*, 7(1), e30260.

Cervelló, I., Martínez-Conejero, J. A., Horcajadas, J. A., Pellicer, A., & Simón, C. (2007). Identification, characterization and co-localization of label-retaining cell population in mouse endometrium with typical undifferentiated markers. *Human Reproduction* (Oxford, England), 22(1), 45–51.

Cervelló, I., Mas, A., Gil-Sanchis, C., Peris, L., Faus, A., Saunders, P. T. K., Critchley, H. O. D., & Simón, C. (2011). Reconstruction of endometrium from human endometrial side population cell lines. *PloS One*, 6(6), e21221.

Cervelló, I., & Simón, C. (2009). Somatic stem cells in the endometrium. *Reproductive Sciences*, 16(2), 200–5.

Challen, G. A., & Little, M. H. (2006). A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells* (Dayton, Ohio), 24(1), 3–12.

Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., & Middleton, J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* (Dayton, Ohio), 25(11), 2739–49.

Chan, R. W. S., & Gargett, C. E. (2006). Identification of label-retaining cells in mouse endometrium. *Stem Cells* (Dayton, Ohio), 24(6), 1529–38.

Chan, R. W. S., Schwab, K. E., & Gargett, C. E. (2004). Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biology of Reproduction*, 70(6), 1738–50.

Das, B., Tsuchida, R., Malkin, D., Koren, G., Baruchel, S., & Yeger, H. (2008). Hypoxia enhances tumor stemness by increasing the invasive and tumorigenic side population fraction. *Stem Cells* (Dayton, Ohio), 26(7), 1818–30.

Davis, E. G., Wilkerson, M. J., & Rush, B. R. (2002). Flow cytometry: clinical applications in equine medicine. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 16(4), 404–10.

De Schauwer, C., Meyer, E., Van de Walle, G. R., & Van Soom, A. (2011). Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology*, 75(8), 1431–43.

De Schauwer, C., Piepers, S., Van de Walle, G. R., Demeyere, K., Hoogewijs, M. K., Govaere, J. L. J., Braeckmans, K., Van Soom, A., & Meyer, E. (2012). In search for cross-reactivity to immunophenotype equine mesenchymal stromal cells by multicolor flow cytometry. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 81(4), 312–23.

De Schauwer, C., van de Walle, G. R., Piepers, S., Hoogewijs, M. K., Govaere, J. L. J., Meyer, E., & van Soom, A. (2013). Successful isolation of equine mesenchymal stromal

cells from cryopreserved umbilical cord blood-derived mononuclear cell fractions. *Equine Veterinary Journal*, 45(4), 518–22.

Deans, R. J., & Moseley, a B. (2000). Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology*, 28(8), 875–84.

Dembinski, J. L., & Krauss, S. (2009). Characterization and functional analysis of a slow cycling stem cell-like subpopulation in pancreas adenocarcinoma. *Clinical & Experimental Metastasis*, 26(7), 611–23.

Dhar, M., Neilsen, N., Beatty, K., Eaker, S., Adair, H., & Geiser, D. (2012). Equine peripheral blood-derived mesenchymal stem cells: isolation, identification, trilineage differentiation and effect of hyperbaric oxygen treatment. *Equine Veterinary Journal*, 44(5), 600–5.

Di Gioacchino, G., Di Campi, C., Zocco, M. A., Piscaglia, A. C., Novi, M., Santoro, M., Santoliquido, A., Flore, R., Tondi, P., Pola, P., Gasbarrini, G., & Gasbarrini, A. (2005). Transdifferentiation of stem cells in pancreatic cells: state of the art. *Transplantation Proceedings*, 37(6), 2662–3.

Dimitrov, R., Timeva, T., Kyurkchiev, D., Stamenova, M., Shterev, A., Kostova, P., Zlatkov, V., Kehayov, I., & Kyurkchiev, S. (2008). Characterization of clonogenic stromal cells isolated from human endometrium. *Reproduction (Cambridge, England)*, 135(4), 551–8.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–7.

Fehrer, C., & Lepperdinger, G. (2005). Mesenchymal stem cell aging. *Experimental Gerontology*, 40(12), 926–30.

Ferreira-Dias, G. M., Serrão, P. M., Durão, J. F., & Silva, J. R. (2001). Microvascular development and growth of uterine tissue during the estrous cycle in mares. *American Journal of Veterinary Research*, 62(4), 526–30.

Flores, I., Canela, A., Vera, E., Tejera, A., Cotsarelis, G., & Blasco, M. a. (2008). The longest telomeres: a general signature of adult stem cell compartments. *Genes & Development*, 22(5), 654–67.

Fogh, J., Holmgren, N. B., & Ludovici, P. P. (1950). A review of cell culture contaminations. *In Vitro*, 7(1), 26–41.

Fortier, M. A., Guilbault, L. A., & Grasso, F. (1988). Specific properties of epithelial and stromal cells from the endometrium of cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, 83(1), 239–48.

Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., & Petrakova, K. . V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 16(3), 381–90.

Frisbie, D. D., & Smith, R. K. W. (2010). Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. *Equine Veterinary Journal*, 42(1), 86–9.

Fuchs, E., Tumbar, T., & Guasch, G. (2004). Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*, 116(6), 769–78.

Ganjam, V. K., & Evans, T. J. (2006). Equine endometrial fibrosis correlates with 11beta-HSD2, TGF-beta1 and ACE activities. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 248(1-2), 104–8.

Gargett, C. E., & Masuda, H. (2010). Adult stem cells in the endometrium. *Molecular Human Reproduction*, 16(11), 818–34.

Gargett, C. E., Schwab, K. E., Zillwood, R. M., Nguyen, H. P. T., & Wu, D. (2009). Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biology of Reproduction*, 80(6), 1136–45.

Gattegno-Ho, D., Argyle, S.-A., & Argyle, D. J. (2012). Stem cells and veterinary medicine: tools to understand diseases and enable tissue regeneration and drug discovery. *The Veterinary Journal*, 191(1), 19–27.

Gerstenberg, C., Allen, W. R., & Stewart, F. (1999). Cell proliferation patterns in the equine endometrium throughout the non-pregnant reproductive cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*, 116(1), 167–75.

Goodell, M. A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A. S., & Mulligan, R. C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(4), 1797–806.

Gronthos, S., Graves, S. E., Ohta, S., & Simmons, P. J. (1994). The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*, 84(12), 4164–73.

Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C. D., Buzney, E. A., Khan, M. K., Flint, A. F., Kunkel, L. M., & Mulligan, R. C. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*, 401(6751), 390–4.

Hadnagy, A., Gaboury, L., Beaulieu, R., & Balicki, D. (2006). SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Experimental Cell Research*, 312(19), 3701–10.

Herzog, E. L., Chai, L., & Krause, D. S. (2003). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*, 102(10), 3483–93.

Hirschmann-Jax, C., Foster, A. E., Wulf, G. G., Nuchtern, J. G., Jax, T. W., Gobel, U., Goodell, M. A., & Brenner, M. K. (2004). A distinct “side population” of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(39), 14228–33.

Hoffmann, C., Ellenberger, C., Mattos, R. C., Aupperle, H., Dhein, S., Stief, B., & Schoon, H.-A. (2009). The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. *Animal Reproduction Science*, 111(2-4), 261–78.

Horwitz, E. M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Deans, R. J., Krause, D. S., & Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7(5), 393–5.

Hulspas, R., & Quesenberry, P. J. (2000). Characterization of neurosphere cell phenotypes by flow cytometry. *Cytometry*, 40(3), 245–50.

Hutchison, N., Fligny, C., & Duffield, J. S. (2013). Resident mesenchymal cells and fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1832(7), 962–71.

Ibrahim, S. F., Diercks, A. H., Petersen, T. W., & van den Engh, G. (2007). Kinetic analyses as a critical parameter in defining the side population (SP) phenotype. *Experimental Cell Research*, 313(9), 1921–6.

Ibrahim, S., Saunders, K., Kydd, J. H., Lunn, D. P., & Steinbach, F. (2007). Screening of anti-human leukocyte monoclonal antibodies for reactivity with equine leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 119(1-2), 63–80.

Ibrahim, S., & Steinbach, F. (2007). Non-HLDA8 animal homologue section anti-leukocyte mAbs tested for reactivity with equine leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 119(1-2), 81–91.

Ikoma, T., Kyo, S., Maida, Y., Ozaki, S., Takakura, M., Nakao, S., & Inoue, M. (2009). Bone marrow-derived cells from male donors can compose endometrial glands in female transplant recipients. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 201(6), 608.e1–8.

Jackson, K. A., Mi, T., & Goodell, M. A. (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(25), 14482–6.

Jones, B. J., & McTaggart, S. J. (2008). Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. *Experimental Hematology*, 36(6), 733–41.

Jonker, J. W., Freeman, J., Bolscher, E., Musters, S., Alvi, A. J., Titley, I., Schinkel, A. H., & Dale, T. C. (2005). Contribution of the ABC transporters Bcrp1 and Mdr1a/1b to the side population phenotype in mammary gland and bone marrow of mice. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 23(8), 1059–65.

Juopperi, T. a. (2012). Back to basics: stem cells and veterinary medicine. *The Veterinary Journal*, 191(2), 139–140.

Kanatsu-Shinohara, M., & Shinohara, T. (2013). Spermatogonial stem cell self-renewal and development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 29, 163–87.

Kato, K., Takao, T., Kuboyama, A., Tanaka, Y., Ohgami, T., Yamaguchi, S., Adachi, S., Yoneda, T., Ueoka, Y., Kato, K., Hayashi, S., Asanoma, K., & Wake, N. (2010). Endometrial cancer side-population cells show prominent migration and have a potential to differentiate into the mesenchymal cell lineage. *The American Journal of Pathology*, 176(1), 381–92.

Kato, K., Yoshimoto, M., Kato, K., Adachi, S., Yamayoshi, A., Arima, T., Asanoma, K., Kyo, S., Nakahata, T., & Wake, N. (2007). Characterization of side-population cells in human normal endometrium. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 22(5), 1214–23.

Keating, A. (2012). Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell*, 10(6), 709–16.

Kebriaei, P., & Robinson, S. (2011). Treatment of graft-versus-host-disease with mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 13(3), 262–8.

Kenney, R. M. (1978). Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*, 172(3), 241–262.

Kenney, R. M., & Doig, P. A. (1986). Equine Endometrial Biopsy. In D. A. Morrow (Ed.), *Current Therapy in Theriogenology 2* (1st editio., pp. 723–729). W.B. Saunders.

Koch, T. G., Berg, L. C., & Betts, D. H. (2009). Current and future regenerative medicine - Principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *The Canadian Veterinary Journal*, 50(February), 155–165.

Koerner, J., Nesic, D., Romero, J. D., Brehm, W., Mainil-Varlet, P., & Grogan, S. P. (2006). Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* (Dayton, Ohio), 24(6), 1613–9.

Kol, A., Walker, N. J., Galuppo, L. D., Clark, K. C., Buerchler, S., Bernanke, A., & Borjesson, D. L. (2013). Autologous point-of-care cellular therapies variably induce equine mesenchymal stem cell migration, proliferation and cytokine expression. *Equine Veterinary Journal*, 45(2), 193–8.

Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I. L., & Grompe, M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Medicine*, 6(11), 1229–34.

Lechner, A., Leech, C. a, Abraham, E. J., Nolan, A. L., & Habener, J. F. (2002). Nestin-positive progenitor cells derived from adult human pancreatic islets of Langerhans contain side population (SP) cells defined by expression of the ABCG2 (BCRP1) ATP-binding cassette transporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293(2), 670–4.

Lehmann, J., Ellenberger, C., Hoffmann, C., Bazer, F. W., Klug, J., Allen, W. R., Sieme, H., & Schoon, H. (2011). Morpho-functional studies regarding the fertility prognosis of mares suffering from equine endometrosis. *Theriogenology*, 76(7), 1326–36.

Lepperdinger, G. (2011). Inflammation and mesenchymal stem cell aging. *Current Opinion in Immunology*, 23(4), 518–24.

Li, L., & Xie, T. (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 605–31.



Li, T., He, H., Liu, R., Wang, S.-X., & Pu, D.-M. (2014). Isolation and identification of epithelial and stromal stem cells from eutopic endometrium of women with endometriosis. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 178, 89–94.

Lovati, A. B., Corradetti, B., Lange Consiglio, A., Recordati, C., Bonacina, E., Bizzaro, D., & Cremonesi, F. (2011). Comparison of equine bone marrow-, umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells. *Veterinary Research Communications*, 35(2), 103–21.

Mackinnon, A., & Forbes, S. (2013). Bone marrow contributions to fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1832(7), 955–61.

Maia, L., Landim-Alvarenga, F. C., Da Mota, L. S. L. S., De Assis Golim, M., Laufer-Amorim, R., De Vita, B., Barberini, D. J., Listoni, A. J., De Moraes, C. N., Heckler, M. C. T., & Amorim, R. M. (2013). Immunophenotypic, immunocytochemistry, ultrastructural, and cytogenetic characterization of mesenchymal stem cells from equine bone marrow. *Microscopy Research and Technique*, 76(6), 618–24.

Mambelli, L. I., Mattos, R. C., Winter, G. H. Z., Madeiro, D. S., Morais, B. P., Malschitzky, E., Miglino, M. A., Kerkis, A., & Kerkis, I. (2014). Changes in expression pattern of selected endometrial proteins following mesenchymal stem cells infusion in mares with endometrosis. *PloS One*, 9(6), e97889.

Mambelli, L. I., Winter, G. H. Z., Kerkis, a, Malschitzky, E., Mattos, R. C., & Kerkis, I. (2013). A novel strategy of mesenchymal stem cells delivery in the uterus of mares with endometrosis. *Theriogenology*, 79(5), 744–50.

Martin, C. M., Meeson, A. P., Robertson, S. M., Hawke, T. J., Richardson, J. A., Bates, S., Goetsch, S. C., Gallardo, T. D., & Garry, D. J. (2004). Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Developmental Biology*, 265(1), 262–275.

Masuda, H., Anwar, S. S., Bühring, H., Rao, J. R., & Gargett, C. E. (2012). A novel marker of human endometrial mesenchymal stem-like cells. *Cell Transplantation*, 21(10), 2201–14.

Masuda, H., Maruyama, T., Hiratsu, E., Yamane, J., Iwanami, A., Nagashima, T., Ono, M., Miyoshi, H., Okano, H. J., Ito, M., Tamaoki, N., Nomura, T., Okano, H., Matsuzaki, Y., & Yoshimura, Y. (2007). Noninvasive and real-time assessment of reconstructed functional human endometrium in NOD/SCID/gamma c(null) immunodeficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(6), 1925–30.

Masuda, H., Matsuzaki, Y., Hiratsu, E., Ono, M., Nagashima, T., Kajitani, T., Arase, T., Oda, H., Uchida, H., Asada, H., Ito, M., Yoshimura, Y., Maruyama, T., & Okano, H. (2010). Stem cell-like properties of the endometrial side population: implication in endometrial regeneration. *PloS One*, 5(4), e10387.

Mathew, G., Timm, E. A., Sotomayor, P., Godoy, A., Montecinos, V. P., Smith, G. J., & Huss, W. J. (2009). ABCG2-mediated DyeCycle Violet efflux defined side population in benign and malignant prostate. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(7), 1053–61.

Meeson, A., Fuller, A., Breault, D. T., Owens, W. A., & Richardson, G. D. (2013). Optimised protocols for the identification of the murine cardiac side population. *Stem Cell Reviews*, 9(5), 731–9.

Mensing, N., Gasse, H., Hambruch, N., Haeger, J.-D., Pfarrer, C., & Staszky, C. (2011). Isolation and characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from the gingiva and the periodontal ligament of the horse. *BMC Veterinary Research*, 7(1), 42.

Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T., & Quiñones-Hinojosa, A. (2010). Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*, 7(2), 150–61.

Ohishi, M., & Schipani, E. (2010). Bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 109(2), 277–82.

Peng, L.-H., Tsang, S.-Y., Tabata, Y., & Gao, J.-Q. (2012). Genetically-manipulated adult stem cells as therapeutic agents and gene delivery vehicle for wound repair and regeneration. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 157(3), 321–30.

Penny, J., Harris, P., Shakesheff, K. M., & Mobasheri, A. (2012). The biology of equine mesenchymal stem cells: phenotypic characterization, cell surface markers and multilineage differentiation. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 17(7), 892–908.

Periwall, S. B., Bhargava, V. L., Farooq, A., Bhatla, N., & Murugesan, K. (1995). Rapid isolation of human endometrial stromal cells with high yield and purity. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 31(November), 744–748.

Petriz, J. (2007). Flow cytometry of the side population (SP). *Current Protocols in Cytometry*, Chapter 9, Unit9.23.

Phinney, D. G. (2007). Biochemical heterogeneity of mesenchymal stem cell populations: clues to their therapeutic efficacy. *Cell Cycle* (Georgetown, Tex.), 6(23), 2884–9.

Pittenger, M. F., Mackay, a M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* (New York, N.Y.), 284(5411), 143–7.

Priedkalns, J., & Leiser, R. (2006). Female Reproductive System. In J. A. Eurell & B. L. Frappier (Eds.), *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology* (6th editio., pp. 256–278). Blackwell Publishing.

Radcliffe, C. H., Flaminio, M. J. B. F., & Fortier, L. A. (2010). Temporal analysis of equine bone marrow aspirate during establishment of putative mesenchymal progenitor cell populations. *Stem Cells and Development*, 19(2), 269–82.

Radtke, C. L., Nino-Fong, R., Esparza Gonzalez, B. P., Stryhn, H., & McDuffee, L. A. (2013). Characterization and osteogenic potential of equine muscle tissue- and periosteal tissue-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *American Journal of Veterinary Research*, 74(5), 790–800.

Rahman, M. (2014). Introduction to Flow Cytometry. AbD Serotec. Acedido a 29 de Julho, 2014, em <http://www.abdserotec.com/introduction-to-flow-cytometry.html>

Ranera, B., Remacha, A. R., Álvarez-Arguedas, S., Castiella, T., Vázquez, F. J., Romero, A., Zaragoza, P., Martín-Burriel, I., & Rodellar, C. (2013). Expansion under hypoxic conditions enhances the chondrogenic potential of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Veterinary Journal* (London, England : 1997), 195(2), 248–51.

Rasmusson, I. (2006). Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research*, 312(12), 2169–79.

Reed, S. a., & Johnson, S. E. (2012). Refinement of Culture Conditions for Maintenance of Undifferentiated Equine Umbilical Cord Blood Stem Cells. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(6), 360–366.

Reyes, M., Lund, T., Lenvik, T., Aguiar, D., Koodie, L., & Verfaillie, C. M. (2001). Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 98(9), 2615–25.

Roobrouck, V. D., Ulloa-Montoya, F., & Verfaillie, C. M. (2008). Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Experimental Cell Research*, 314(9), 1937–44.

Rossignoli, F., Caselli, A., Grisendi, G., Piccinno, S., Burns, J. S., Murgia, A., Veronesi, E., Loschi, P., Masini, C., Conte, P., Paolucci, P., Horwiz, E. M., & Dominici, M. (2013). Isolation, characterization, and transduction of endometrial decidual tissue multipotent mesenchymal stromal/stem cells from menstrual blood. *BioMed Research International*, 2013, 901821.

Sasson, I. E., & Taylor, H. S. (2008). Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1127(1), 106–15.

Scharenberg, C. W. (2002). The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood*, 99(2), 507–512.

Schlafer, D. H. (2007). Equine endometrial biopsy: enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques? *Theriogenology*, 68(3), 413–22.

Schnabel, L. V, Fortier, L. a, Wayne McIlwraith, C., & Nobert, K. M. (2013). Therapeutic use of stem cells in horses: Which type, how, and when? *Veterinary Journal* (London, England : 1997), 197(3), 570–7.

Schwab, K. E., & Gargett, C. E. (2007). Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Human Reproduction* (Oxford, England), 22(11), 2903–11.

Sethe, S., Scutt, A., & Stolzing, A. (2006). Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Research Reviews*, 5(1), 91–116.

Shell, K., Raabe, O., Freitag, C., Ohrndorf, A., Christ, H.-J., Wenisch, S., & Arnhold, S. (2013). Comparison of Equine Adipose Tissue-Derived Stem Cell Behavior and Differentiation Potential Under the Influence of 3% and 21% Oxygen Tension. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(2), 74–82.

Snider, T. A., Sepoy, C., & Holyoak, G. R. (2011). Equine endometrial biopsy reviewed: observation, interpretation, and application of histopathologic data. *Theriogenology*, 75(9), 1567–81.

Sotiropoulou, P.A., Perez, S. A., Salagianni, M., Baxevanis, C. N., & Papamichail, M. (2006). Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* (Dayton, Ohio), 24(2), 462–71.

Storms, R. W., Goodell, M. A., Fisher, A., Mulligan, R. C., & Smith, C. (2000). Hoechst dye efflux reveals a novel CD7(+)CD34(-) lymphoid progenitor in human umbilical cord blood. *Blood*, 96(6), 2125–33.

Strioga, M., Viswanathan, S., Darinskas, A., Slaby, O., & Michalek, J. (2012). Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells and Development*, 21(14), 2724–52.

Summer, R., Kotton, D. N., Sun, X., Ma, B., Fitzsimmons, K., & Fine, A. (2003). Side population cells and Bcrp1 expression in lung. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 285(1), L97–104.

Szilvassy, S. J. (2004). The biology of hematopoietic stem cells. *Archives of Medical Research*, 34(6), 446–60.

Szóstek, A. Z., Siemieniuch, M. J., Lukasik, K., Galvão, A. M., Ferreira-Dias, G. M., & Skarzynski, D. J. (2012). mRNA transcription of prostaglandin synthases and their products in the equine endometrium in the course of fibrosis. *Theriogenology*, 78(4), 768–76.

Taylor, H. S. (2004). Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 292(1), 81–5.

Telford, W. G., Bradford, J., Godfrey, W., Robey, R. W., & Bates, S. E. (2007). Side population analysis using a violet-excited cell-permeable DNA binding dye. *Stem Cells* (Dayton, Ohio), 25(4), 1029–36.

Terskikh, V. V., Vasil'ev, a. V., & Vorotelyak, E. a. (2008). SP phenotype of stem cells. *Biology Bulletin*, 35(5), 441–445.

Thibodeaux, J. K., Roussel, J. D., Menezo, Y., Godke, R. A., & Goodeaux, L. L. (1991). A method for in vitro cell culture of superficial bovine uterine endometrial epithelium. *J Tiss Cult Meth*, 13, 247–251.

Tuan, R. S., Boland, G., & Tuli, R. (2003). Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Research & Therapy*, 5(1), 32–45.

Uchida, N., Leung, F. Y. K., & Eaves, C. J. (2002). Liver and marrow of adult mdr-1a/1b(-/-) mice show normal generation, function, and multi-tissue trafficking of primitive hematopoietic cells. *Experimental Hematology*, 30(8), 862–9.

Ueda, T., Brenner, S., Malech, H. L., Langemeijer, S. M., Perl, S., Kirby, M., Phang, O. A., Krouse, A. E., Donahue, R. E., Kang, E. M., & Tisdale, J. F. (2005). Cloning and functional analysis of the rhesus macaque ABCG2 gene. Forced expression confers an SP phenotype among hematopoietic stem cell progeny in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(2), 991–8.

Vater, C., Kasten, P., & Stiehler, M. (2011). Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomaterialia*, 7(2), 463–77.

Vidal, M. a, Kilroy, G. E., Lopez, M. J., Johnson, J. R., Moore, R. M., & Gimble, J. M. (2007). Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Veterinary Surgery : VS*, 36(7), 613–22.

Wagers, A. J., & Weissman, I. L. (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell*, 116(5), 639–48.

Wang, K., Wu, X., Wang, J., & Huang, J. (2013). Cancer stem cell theory: therapeutic implications for nanomedicine. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 899–908.

Watson, E. D., Aubrey, E. S., Zanecosky, H. G., & Sertich, P. L. (1992). Isolation and culture of glandular epithelial and stromal cells from the endometrium of mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, 95(1), 269–75.

Xiang, L., Chan, R. W., Ng, E. H., & Yeung, W. S. (2014). Nanoparticle labeling identifies slow cycling human endometrial stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(4), 84.

Zhang, L., Rees, M. C., & Bicknell, R. (1995). The isolation and long-term culture of normal human endometrial epithelium and stroma. Expression of mRNAs for angiogenic polypeptides basally and on oestrogen and progesterone challenges. *Journal of Cell Science*, 108 ( Pt 1, 323–31.

Zhang, Z., Paria, B. C., & Davis, D. L. (1991). Pig endometrial cells in primary culture: morphology, secretion of prostaglandins and proteins, and effects of pregnancy. *Journal of Animal Science*, 69(7), 3005–15.

Zhou, S., Morris, J. J., Barnes, Y., Lan, L., Schuetz, J. D., & Sorrentino, B. P. (2002). Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice,

and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99(19), 12339–44.

Zhou, S., Schuetz, J. D., Bunting, K. D., Colapietro, a M., Sampath, J., Morris, J. J., Lagutina, I., Grosveld, G. C., Osawa, M., Nakauchi, H., & Sorrentino, B. P. (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. Nature Medicine, 7(9), 1028–34.

**ANEXO 1** – Tabela com vários marcadores CD e outras moléculas usadas no estudo e caracterização de células estaminais. Descrições obtidas de GeneCards (<http://www.genecards.org/>) exceto nos casos assinalados.

| <b>Marcador</b> | <b>Caracterização e função</b>  |
|-----------------|---|
| CD9             | Glicoproteína transmembranar pertencente à superfamília das tetraspaninas, importante para vários processos celulares como diferenciação, adesão e transdução de sinal; gene codificante importante na supressão da motilidade de células neoplásicas e metástase.                |
| CD11b           | Cadeia alfa M da integrina, também conhecida como receptor do complemento 3, importante na adesão de neutrófilos e monócitos para estimulação do endotélio e na fagocitose mediada pelo complemento.  |
| CD13            | Aminopeptidase N, presente em várias membranas plasmáticas do organismo, importante na digestão de péptidos, função noutros tecidos menos clara, mas alterações do gene codificante parecem estar relacionados com vários tipos de leucemia ou linfoma.                           |
| CD14            | Proteína de superfície especialmente expressa em monócitos e macrófagos, importante na mediação da resposta imunitária inata aos polissacáridos bacterianos.  |
| CD19            | Proteína presente na superfície de linfócitos B que funciona com o receptor de antígenos dos linfócitos B para diminuir o limiar de estimulação do receptor de antígenos.   |
| CD29            | Subunidade beta das integrinas, responsáveis por mediar processos de adesão e reconhecimento celular.   |
| CD31            | Proteína encontrada à superfície de plaquetas, monócitos, neutrófilos e algumas células T, estando também presente nas junções intercelulares do endotélio. Possivelmente envolvida na migração leucocitária, angiogénese e ativação das integrinas.                              |
| CD34            | Proteína possivelmente relacionada com a ligação de células estaminais à matriz medular ou células do estroma da medula óssea, com um possível papel na hematopoiese precoce.   |
| CD38            | Proteína expressa em vários tecidos e células, especialmente em leucócitos, importante na adesão celular, transdução de sinal e vias de sinalização através de cálcio.  |
| CD44            | Glicoproteína de superfície envolvida em processos de interação célula-célula, adesão e migração celular, receptor do ácido hialurónico com capacidade de interação com outros ligandos; participa em processo de ativação de linfócitos, hematopoiese e metastização neoplásica. |



|                |   |
|----------------|---|
| CD45           | Fosfoproteína transmembranar associada com molécula reguladora da ativação de linfócitos B e T.   |
| CD71           | Receptor da transferrina, necessário para interiorização celular de ferro no desenvolvimento dos eritrócitos e sistema nervoso.   |
| CD73           | Proteína da membrana plasmática responsável pela conversão de nucleótidos extracelulares em nucleósidos transportáveis através da membrana, normalmente utilizado como marcador de diferenciação de linfócitos.             |
| CD79 $\alpha$  | Proteína alfa do receptor de antígeno dos linfócitos B.   |
| CD79 $\beta$   | Proteína beta do receptor de antígeno dos linfócitos B.   |
| CD90 (Thy-1)   | Potencial papel em interações célula-célula ou célula-ligando durante sinaptogénese e outros eventos no cérebro.  |
| CD105          | Glicoproteína transmembranar presente no endotélio vascular, componente do <i>transforming growth factor beta</i> , com potencial papel na ligação de células endoteliais a integrinas.                                     |
| CD106          | Pertencente à superfamília das imunoglobulinas, proteína da superfície celular expressa em células do endotélio ativadas por citocinas, mediadora da adesão entre leucócitos e endotélio e transdução do sinal.             |
| CD133          | Proteína transmembranar localizada nas protusões celulares, frequentemente expressa em células estaminais adultas, pensando-se que seja importante na supressão da diferenciação.   |
| CD146          | Proteína implicada na adesão celular e coesão das junções intercelulares do endotélio no tecido vascular; potencial molécula de adesão ativa na crista neural.  |
| CD166          | Proteína que se liga ao antígeno CD6 dos linfócitos T, implicada na adesão celular e migração.  |
| c-kit          | Também conhecido como CD117, com papel na regulação da sobrevivência e proliferação celular, hematopoiese, manutenção de células estaminais, gametogénese, melanogénese e desenvolvimento, migração e função de mastócitos. |
| HLA-DR         | <i>Human Leukocyte Antigen-DR</i> , parte do locus MHC-II (Penny <i>et al.</i> , 2012).   |
| MHC I e MHC II | Apresentação de antígenos processados a linfócitos T.   |
| Nanog          | Factor de transcrição envolvido na capacidade de proliferação e autorrenovação das células da massa celular interna e das células estaminais embrionárias.  |
| Oct-4          | Factor de transcrição também conhecido como POU5F1, importante no desenvolvimento embrionário e pluripotência; alterações da sua expressão nos  |

|           |   |
|-----------|---|
|           | tecidos adultos estão relacionadas com tumorigénese.  |
| Sca-1     | <i>Stem cell antigen-1</i> , presente em células estaminais hematopoiéticas, pertencente à família Ly6 ( <i>lymphocyte antigen 6 complex</i> ) ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/110454">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/110454</a> ). |
| Sox2      | Factor de transcrição que atua com o Oct-4 no controlo da expressão de vários genes relacionados com o desenvolvimento embrionário, essencial para a pluripotência das células estaminais embrionárias.   |
| SSEA-1    | <i>Stage-Specific Embryonic Antigen 1</i> , proteína que origina carboidratos fucosilados.  |
| SSEA-3    | <i>Stage-Specific Embryonic Antigen 3</i> (sem função determinada) (Penny <i>et al.</i> , 2012).  |
| SSEA-4    | <i>Stage-Specific Embryonic Antigen 4</i> (sem função determinada) (Penny <i>et al.</i> , 2012).  |
| Stro-1    | Função desconhecida (Penny <i>et al.</i> , 2012).   |
| Tra-1-81  | Antigénio de superfície de função desconhecida (Penny <i>et al.</i> , 2012).  |
| Tra-1-160 | Antigénio de superfície de função desconhecida (Penny <i>et al.</i> , 2012).  |